

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|---|---|
| (51) 国際特許分類6 C12N 15/13, 9/04, 1/21, C12P 19/02, 7/60 | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/20763 (43) 国際公開日 1999年4月29日 (29.04.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP98/04612 (22) 国際出願日 1998年10月13日 (13.10.98) (30) 優先権データ 特願平9/285280 1997年10月17日 (17.10.97) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 斎藤善正(SAITO, Yoshimasa)[JP/JP] 〒666-0151 兵庫県川西市美山台1-4-20 Hyogo, (JP) 石井芳則(ISHII, Yoshinori)[JP/JP] 〒651-1223 兵庫県神戸市北区桂木3-27-15 Hyogo, (JP) 野口祐嗣(NOGUCHI, Yuji)[JP/JP] 〒490-1114 愛知県海部郡菰目寺町大字下萱津字五反田31-1 Aichi, (JP) 吉川浩司(YOSHIKAWA, Koji)[JP/JP] 〒300-1217 茨城県牛久市さくら台1-57-5 Ibaraki, (JP) | 添田慎介(SOEDA, Shinsuke)[JP/JP] 〒451-0032 愛知県名古屋市中区数寄屋町8-14 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 (湯木ビル) Osaka, (JP) (81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 | |
| (54)Title: D-SORBITOL DEHYDROGENASE, GENES THEREOF AND USE OF THE SAME (54)発明の名称 D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ、その遺伝子およびそれらの用途 (57) Abstract Three subunits constituting D-sorbitol dehydrogenase (SLDH); genes encoding them; a process for producing SLDH by culturing cells transformed by expression vectors containing promoter genes appropriate for expressing the above genes and the above-mentioned genes; and a process for producing L-sorbose or 2-keto-L-gulonic acid (2KLGA) by using the above culture. This process permits 2KLGA as a precursor of L-ascorbic acid to be easily produced in a large amount. | | |

(57)要約

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ (SLDH) を構成する3つのサブユニット、それらをコードする遺伝子、該遺伝子の発現に好適なプロモーター遺伝子および該遺伝子群を含む発現ベクターで形質転換された細胞を培養することによるSLDHの製造方法である。また、該培養物を用いたL-ソルボースまたは2-ケト-L-グルロン酸 (2KLG A) の製造方法である。本法によれば、L-アスコルビン酸の前駆物質である2KLG Aを簡単に且つ大量に製造することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|-----------------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール |
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SI | スロヴェニア |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LR | リベリア | SK | スロヴァキア |
| AT | オーストリア | GA | ガボン | LS | レソト | SL | シエラ・レオネ |
| AU | オーストラリア | GB | 英国 | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AZ | アゼルバイジャン | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SZ | スワジランド |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | TD | チャード |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国 | TR | トルコ |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| BR | ブラジル | HR | クロアチア | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CF | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CH | スイス | IN | インド | NL | オランダ | YU | ユーゴスラビア |
| CI | コートジボワール | IS | アイスランド | NO | ノルウェー | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NZ | ニュージーランド | ZW | ジンバブエ |
| CN | 中国 | JP | 日本 | PL | ポーランド | | |
| CU | キューバ | KE | ケニア | PT | ポルトガル | | |
| CY | キプロス | KG | キルギスタン | RO | ルーマニア | | |
| CZ | チェッコ | KP | 北朝鮮 | RU | ロシア | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | SD | スーダン | | |
| DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | SE | スウェーデン | | |
| EE | エストニア | LC | セントルシア | | | | |

明 細 書

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ、その遺伝子およびそれらの用途

5 技術分野

本発明は、D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ（以下、SLDHという）活性を有するタンパク質およびその各サブユニット、それらをコードする遺伝子、該遺伝子群を用いた遺伝子操作によるL-ソルボースおよび2-ケト-L-グルロン酸（以下、2KLG Aという）の製造方法、ならびにそれらの製造に関わる発現系に関する。

10

背景技術

L-ソルボースは、ライヒシュタイン法によるL-アスコルビン酸（ビタミンC）合成における重要な中間体である（第1図を参照）。D-ソルビトールを化学的に酸化すると生成物の約半分がD-ソルボースになるのに対し、SLDH活性を有する微生物にD-ソルビトールを接触させると約95%の収率でL体のみが得られることから、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する工程には従来より発酵法が用いられてきた。

15

一方、2KLG Aは、工業的にはL-ソルボースを化学的に酸化することにより合成されている。L-ソルボースデヒドロゲナーゼ（SDH）およびL-ソルボソンドヒドロゲナーゼ（SNDH）による2段階の酵素的酸化反応を経由してL-ソルボースを2KLG Aに変換する微生物が知られてはいるが、いずれも2KLG Aの生産量は低く、いまだ工業的生産には応用されていないのが現状である。

20

発酵法によって2KLG Aを従来よりも効率よく生成させ得る方法として、SLDH遺伝子を単離し、これをSDHおよびSNDH活性を有する微生物に導入

25

することによりD-ソルビトールから2KLGAを合成することができる組換え微生物を作製し、該微生物にD-ソルビトールを接触させる方法が考えられる。

したがって、本発明の目的は、上記の2KLGAの発酵生産法を確立するためのSLDH遺伝子を提供することであり、また、該遺伝子で形質転換された宿主微生物、特にSDHおよびSNDH活性を有する微生物を提供することである。

さらに、本発明の目的は、該微生物を用いてD-ソルビトールからL-ソルボースまたは2KLGAを製造する方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、該SLDH遺伝子で形質転換された宿主微生物の培養による組換えSLDHの製造方法並びに該SLDHを用いた酵素法によるL-ソルボースの製造方法を提供することである。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、SLDH活性を有する酢酸菌から該酵素の3つのサブユニットのコード領域およびそれらのプロモーター領域を含むDNAをクローニングすることに成功した。さらに、本発明者らは該DNAを有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる組換え宿主細胞を培養してSLDHを得るとともに、該培養物を用いてD-ソルビトールをL-ソルボースに効率よく変換することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下に示す通りである。

[1] 下記の性質を有するポリペプチド。

(1) 分子量：約62kDa (SDS-PAGE)、約60kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

(2) N末端側のアミノ酸配列が Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly Val Ala Gly Ala (配列表配列番号8) または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸

配列である

(3) 下記の性質を有するポリペプチドと複合体を形成してD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る

5 (a) 分子量：約20 kDa (SDS-PAGE), 約18 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

(b) N末端側のアミノ酸配列が Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Ser (配列表配列番号9) または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

10 [2] 下記の性質を有するポリペプチド。

(1) 分子量：約20 kDa (SDS-PAGE), 約18 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

15 (2) N末端側のアミノ酸配列が Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Ser (配列表配列番号9) または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

(3) 下記の性質を有するポリペプチドと複合体を形成してD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る

20 (a) 分子量：約62 kDa (SDS-PAGE), 約60 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

(b) N末端側のアミノ酸配列が Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly Val Ala Gly Ala (配列表配列番号8) または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

25 [3] 下記の性質を有するポリペプチド。

(1) チトクロームc活性を有する

- (2) 分子量：約 51 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)
- (3) N末端側のアミノ酸配列が Met Arg Glu Gly Asn Lys Ala Gly Ile Arg Arg Leu Phe Leu Pro Ala Ala Ile Ala Ser (配列表配列番号 10) または該アミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列であり、且つ 3 カ所のヘム結合部位コンセンサス配列 (Cys Xaa Xaa Cys His ; 配列表配列番号 11) を含む
- 5 [4] グルコンobacter・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) IFO 3254 株由来である上記 [1] ~ [3] のいずれかのポリペプチド。
- [5] 上記 [1] および [2] のポリペプチドを含んでなり、D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質。
- 10 [6] さらに上記 [3] のポリペプチドを含んでなる上記 [5] のオリゴマー蛋白質。
- [7] 以下の (a) 又は (b) のポリペプチド。
- (a) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
- 15 (b) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ以下の (c) 又は (d) のポリペプチドとともに D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質を形成することができるポリペプチド
- (c) 配列表配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
- 20 (d) 配列表配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド
- [8] 以下の (a) 又は (b) のポリペプチド。
- (a) 配列表配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (b) 配列表配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ以下の (c) 又は (d) のポリペプチドとともに D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触
- 25

媒し得るオリゴマー蛋白質を形成することができるポリペプチド

(c) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

5 [9] 以下の (a) 又は (b) のポリペプチド。

(a) 配列表配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列表配列番号 5 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つチトクローム c 活性を有するポリペプチド

10 [1 0] グルコノバクター属に属する細菌由来である上記 [7] ～ [9] のいずれかのポリペプチド。

[1 1] 上記 [7] および [8] のポリペプチドを含んでなり、D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質。

15 [1 2] さらに上記 [9] のポリペプチドを含んでなる上記 [1 1] のオリゴマー蛋白質。

[1 3] 上記 [7] のポリペプチドをコードする DNA、特に、以下の (a) または (b) の DNA。

(a) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA

20 (b) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA

[1 4] 上記 [8] のポリペプチドをコードする DNA、特に、以下の (a) または (b) の DNA。

(a) 配列表配列番号 4 に示される塩基配列中塩基番号 1 2 4 ～ 5 9 1 で示される塩基配列からなる DNA

25 (b) 上記 (a) の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA、就中、以下の (c) または (d) の DNA

- (c) 配列表配列番号 4 に示される塩基配列中塩基番号 1 ～ 591 で示される塩基配列からなる DNA
- (d) 上記 (c) の塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる DNA
- 5 [15] 上記 [9] のポリペプチドをコードする DNA、特に、以下の (a) または (b) の DNA。
- (a) 配列表配列番号 6 に示される塩基配列からなる DNA
- (b) 配列表配列番号 6 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA
- 10 [16] グルコノバクター属に属する細菌由来である上記 [13] ～ [15] のいずれかの DNA。
- [17] 以下の (a) または (b) の DNA からなるプロモーター遺伝子。
- (a) 配列表配列番号 7 に示される塩基配列中塩基番号 1 ～ 680 で示される塩基配列からなる DNA
- 15 (b) 上記 (a) の塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、且つ微生物においてプロモーター活性を有する DNA。
- [18] グルコノバクター属に属する細菌由来である上記 [17] のプロモーター遺伝子。
- [19] 上記 [13] ～ [16] のいずれかの DNA を含む組換えベクター。
- 20 [20] 上記 [13] および [14] の DNA を機能的に含む発現ベクター。
- [21] さらに上記 [15] の DNA を機能的に含む上記 [20] の発現ベクター。
- [22] 上記 [17] または [18] のプロモーター遺伝子を含む発現ベクター。
- 25 [23] 上記 [13] および [14] の DNA が該プロモーター遺伝子の下流に機能的に配置される上記 [22] の発現ベクター。

〔24〕 さらに上記〔15〕のDNAが該プロモーター遺伝子の下流に機能的に配置される上記〔23〕の発現ベクター。

〔25〕 上記〔19〕～〔24〕のいずれかのベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体、特に、該宿主細胞がL-ソルボースを2KLG Aに変換する能力を有するものである該形質転換体。

〔26〕 上記〔20〕,〔21〕,〔23〕または〔24〕のいずれかの発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物からD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質を採取することを含む該オリゴマー蛋白質の製造方法。

10 〔27〕 上記〔20〕,〔21〕,〔23〕または〔24〕のいずれかの発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含むL-ソルボースの製造方法。

15 〔28〕 上記〔20〕,〔21〕,〔23〕または〔24〕のいずれかの発現ベクターで形質転換されたL-ソルボースを2KLG Aに変換する能力を有する宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含む2KLG Aの製造方法。

20 本発明のSLDHをコードする遺伝子群を含む発現ベクターでL-ソルボースを2KLG Aに変換する能力を有する細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養して、該培養物にD-ソルビトールを接触させることによりD-ソルビトールから直接2KLG Aを簡単かつ大量に製造することができる。したがって、本法によりL-アスコルビン酸の製造工程を大幅に簡略化することが可能となる。

図面の簡単な説明

25 第1図は、ライヒシュタイン法によるL-アスコルビン酸合成の反応スキームを示す図である。

第2図は、ラムダファージクローン#7 DNA並びにプラスミドpSD37R

および p B L 7 S a l 7 の制限酵素地図を示す図である。

第3図は、プラスミド p S L D H 3 の構築法を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 5 本発明の S L D H は大小2つのサブユニットを含んでなるオリゴマー蛋白質、より好ましくは、さらにチトクローム c 様のポリペプチドを含んでなるオリゴマー蛋白質である。各サブユニットはそれぞれ以下の特徴を有する。

大サブユニット：

- 10 (1) 分子量：約 6 2 k D a (SDS-PAGE), 約 6 0 k D a (アミノ酸配列に基づく計算値)

(2) N末端側のアミノ酸配列が Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly Val Ala Gly Ala (配列表配列番号 8) または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

- 15 小サブユニット：

- (1) 分子量：約 2 0 k D a (SDS-PAGE), 約 1 8 k D a (アミノ酸配列に基づく計算値)

- 20 (2) N末端側のアミノ酸配列が Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Ser (配列表配列番号 9) または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

チトクローム c 様ポリペプチド：

- (1) 分子量：約 5 1 k D a (アミノ酸配列に基づく計算値)

- 25 (2) N末端側のアミノ酸配列が Met Arg Glu Gly Asn Lys Ala Gly Ile Arg Arg Leu Phe Leu Pro Ala Ala Ile Ala Ser (配列表配列番号 1 0) または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ

酸配列であり、且つ3カ所のヘム結合部位コンセンサス配列 (Cys Xaa Xaa Cys His ; 配列表配列番号10) を含む

5 本発明のSLDHは、上記の特徴を有する限りその由来に特に制限はなく、天然に存在する生物起源のもの他、自然もしくは人工の変異体または異種のSLDH遺伝子を導入して得られる形質転換体由来のものも含まれる。好ましくは酢酸菌、特にグルコノバクター属に属する細菌、より好ましくはグルコノバクター・オキシダンス、就中グルコノバクター・オキシダンスIFO3254株由来のSLDHが例示される。

10 好ましい態様においては、本発明のSLDHは配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる大サブユニットまたはその均等物、および配列表配列番号3に示されるアミノ酸配列からなる小サブユニットまたはその均等物を含んでなるオリゴマー蛋白質であり、より好ましい態様においては、本発明のSLDHは配列表配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるチトクロームc様ポリペプチドまたはその均等物をさらに含んでなるオリゴマー蛋白質である。ここで「均等物」
15 とは、本発明のSLDHの理化学的性質を変化させない範囲で1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを意味する。

20 本発明のSLDHは、(1) 該酵素を産生する細胞または組織の培養物を原料として単離精製する方法、(2) 化学的に合成する方法または(3) 遺伝子組換え技術等の公知手法を適宜用いることによって取得することができる。(1)の方法の好ましい一実施態様として以下の方法が例示される。

25 D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する能力を有する微生物（例えば、グルコノバクター・オキシダンスIFO3254株等）を適当な液体培地中で培養し、得られる培養物からSLDH活性を有する画分を分離回収する（例えば、グルコノバクター・オキシダンスIFO3254株の場合、SLDH活性は細胞膜画分に見出されるので、培養物を遠心して菌体を回収後、超音波処理やリゾチ

ームおよび浸透圧ショック等により該菌体を破碎し、10,000rpm程度で遠心して上清を回収した後、さらに30,000～40,000rpm程度で超遠心処理して沈殿（膜画分）を得る）。次いで、SLDH活性画分が膜画分である場合には、得られた膜画分から適当な界面活性剤、好ましくはTriton X-100等の変性力の弱い界面活性剤等を用いてSLDHを可溶化する。目的のSLDHは、得られた可溶化画分から、酵素タンパク質の単離精製に一般に利用されている分離技術を適宜組み合わせて用いることによって精製することができる。具体的には、例えば、塩析、溶媒沈殿法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、非変性PAGE、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー等の荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

化学合成による本発明のSLDHの製造は、例えば配列表配列番号1および3、好ましくはさらに配列表配列番号5に示されるアミノ酸配列を基にして、各配列の全部または一部をペプチド合成機を用いて合成し、得られるポリペプチドを適当な再構成条件下で複合体形成させることにより行うことができる。

また、遺伝子組換え技術を用いる本発明のSLDHの製造は、以下に詳述する本発明のSLDHの各サブユニットをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から該酵素を採取することによって行うことができる。

本発明のSLDHの大サブユニット、小サブユニットおよびチトクロームc様ポリペプチドをコードするDNAは、それぞれ配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその均等物をコードするDNA、配列表配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその均等物をコードするDNAおよび配列表配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるポリペ

チドまたはその均等物をコードするDNAである。ここで「均等物」とは、本発明のSLDHの理化学的性質を変化させない範囲で1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを意味する。

5 好ましくは、本発明のSLDHの大サブユニット、小サブユニットおよびチトクロームc様ポリペプチドをコードするDNAは、それぞれ配列表配列番号2に示される塩基配列から実質的になるDNA、配列表配列番号4に示される塩基配列中塩基番号124～591で示される塩基配列から実質的になるDNA、配列表配列番号6に示される塩基配列から実質的になるDNAである。ここで「実質的になるDNA」とは、上記の特定の塩基配列からなるDNAに加えて、ストリン
10 ジェントな条件（本発明では、塩基配列において約60%以上の相同性を有するDNAがハイブリダイズし得る条件）において、上記の特定塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つ該特定塩基配列からなるDNAがコードするペプチドと同様の理化学的性質を有するペプチドをコードするDNAを意味する。

15 本発明の別の好ましい態様においては、本発明のSLDHの小サブユニットをコードするDNAは、配列表配列番号4に示される塩基配列中塩基番号1～591で示される塩基配列からなるDNA、あるいは該塩基配列において1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、且つ本発明のSLDH小サブユニットの理化学的性質を有するペプチドをコードするDNAである。
20 このようなDNAは初期翻訳産物としてN末端にリーダー配列を有する小サブユニット前駆体を与える。該リーダー配列は細胞内のプロテアーゼにより切断除去されて成熟ポリペプチドとなる。

さらに好ましい態様においては、本発明のSLDHの大サブユニット、小サブユニットおよびチトクロームc様ポリペプチドをコードするDNAは、1つの
25 プロモーター遺伝子の制御下にポリシストロニックに発現し得るようにタンデムに配列された1個の遺伝子群の形態で存在する。このような態様において、個々の

サブユニットをコードするオープンリーディングフレーム（ORF）はお互いに該遺伝子群上でその一部が重複していてもよい。より好ましくは、該遺伝子群は配列表配列番号7に示されるように、5'上流側から小サブユニットDNA、大サブユニットDNA、チトクロームc様ポリペプチドDNAの順に配列される。

5 本発明のDNAはいかなる方法で得られるものであってもよい。例えば、mRNAから調製されるcDNA、ゲノミックDNAから調製されるDNA、化学合成により得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させることにより得られるDNA、およびこれらの方法を適宜組み合わせて構築されるDNAなどが含まれる。

10 本発明のDNAは、例えば、以下の方法により単離することができる。まず、SLDHを産生する細胞または組織より、上記のような方法に従って該酵素を完全または部分精製し、各サブユニットのN末端部分アミノ酸配列をエドマン法により決定する。また、該酵素の各サブユニットを配列特異的プロテアーゼで部分分解して得られるオリゴペプチドのアミノ酸配列を同様にエドマン法により決定する。

15 決定された部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーまたはプローブとして用いて、SLDHを産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー（もしくはプラーク）ハイブリダイゼーション法によって各サブユニットをコードするDNAをクローニングする。

20 あるいは、完全または部分精製されたSLDHまたはそのサブユニットの全部または一部を抗原として該酵素またはそのサブユニットに対する抗体を常法にしたがって作製し、SLDHを産生する細胞または組織より調製されたcDNAまたはゲノミックDNAライブラリーから、抗体スクリーニングにより該酵素の各サブユニットをコードするDNAをクローニングすることもできる。

25 本発明のプロモーター遺伝子は、配列表配列番号7に示される塩基配列中塩基番号1～680で示される塩基配列からなるDNA、あるいは該塩基配列におい

て1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、且つ微生物においてプロモーター活性を有するDNAである。ここで「微生物」とは、細菌や放線菌などの原核生物が元来有するプロモーターが機能し得るものであれば特に制限はないが、好ましくは、細菌（例えば大腸菌、枯草菌等）、放線菌などの原核生物および酵母等の一部の真核生物が挙げられる。

本発明のプロモーター遺伝子は、上記の特徴を有する限りその由来は特に限定されない。本発明のプロモーター遺伝子は、好ましくは本発明のSLDHの各サブユニットをコードするDNAの転写を制御するプロモーターである。したがって該プロモーター遺伝子は該SLDH同様、好ましくはグルコノバクター属に属する細菌、より好ましくはグルコノバクター・オキシダンス、就中グルコノバクター・オキシダンスIFO3254株由来のものである。

本発明のプロモーター遺伝子は、例えば、上記のSLDHの各サブユニットをコードするDNAの単離方法と同様にして、SLDHを産生する細胞または組織より調製されるゲノミックDNAライブラリーからコロニー（プラーク）ハイブリダイゼーションまたは抗体スクリーニングによりクローニングすることができる。

本発明はまた、上記のいずれかのDNAを含有する組換えベクターに関する。本発明の組換えベクターは、原核細胞および／または真核細胞の各種宿主細胞内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。当該組換えベクターは、簡便には当分野において入手可能なクローニングベクターまたは発現ベクターに上記のいずれかのDNAを適当な制限酵素部位を利用して挿入することによって調製することができる。

特に、本発明の組換えベクターは、SLDHの大小サブユニットをそれぞれコードするDNAを機能的に含む発現ベクター、より好ましくはさらにチトクロームc様ポリペプチドをコードするDNAを機能的に含む該発現ベクターである。

- ここで「機能的に含む」とは、そのベクターに適合する宿主細胞内で該DNAが転写され、それにコードされるポリペプチドが産生され得るように該DNAが配置されていることを意味する。好ましくは、プロモーター領域、開始コドン、各サブユニットのいずれかをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域が連続的に配列された発現カセットを有するベクターである。宿主が原核細胞の場合には、各サブユニットをコードするDNAは、1つのプロモーター遺伝子の制御下でポリシストロニックに転写発現され得るように、タンデムに配列された形態で該プロモーター遺伝子の下流に挿入されることが好ましい。用いられる発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種宿主細胞内で機能して、その下流に配置された遺伝子を発現させ得るプロモーター領域と、該遺伝子の転写を終結させるシグナル、すなわちターミネーター領域を含有し、該プロモーター領域と該ターミネーター領域とが少なくとも1つのユニークな制限酵素認識部位を含む配列を介して連結されたものであれば特に制限はないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していることが好ましい。
- さらに所望により、該発現ベクターは開始コドンおよび終止コドンを、それぞれプロモーター領域の下流およびターミネーター領域の上流に含んでもよい。
- 宿主細胞として細菌を用いる場合、一般に発現ベクターは上記のプロモーター領域およびターミネーター領域に加えて宿主細胞内で自律複製し得る複製可能単位を含む必要がある。プロモーター領域には、プロモーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno (SD) 配列が含まれる。例えば、宿主が大腸菌の場合には、プロモーター領域として *t r p* プロモーター、*l a c* プロモーター、*r e c A* プロモーター、*l p p* プロモーター、*t a c* プロモーター等が、また、宿主が枯草菌の場合には、プロモーター領域として *S P O 1* プロモーター、*S P O 2* プロモーター、*p e n P* プロモーター等が挙げられる。ターミネーター領域としては、通常使用されている天然または合成のターミネーターを用いることができる。また、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイ

シン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。開始コドンとしては通常ATGが用いられるが、場合によってGTGを使用することもできる。終止コドンとしては常用のTGA、TAAおよびTAGが用いられる。

本発明のSLDHをコードするDNAが該酵素を産生する細胞または組織由来のゲノミックDNAから調製され、本来のプロモーターおよびターミネーター領域を含有する形態で得られる場合には、本発明の発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞内で複製保持または自律増殖できる公知のクローニングベクターの適当な部位に該DNAを挿入することによって調製することができる。用いられるクローニングベクターとしては、宿主が細菌の場合、大腸菌由来のpBR系ベクター、pUC系ベクター等、あるいは枯草菌由来のpUB110、pTP5、pC194等が例示される。

好ましくは、本発明の発現ベクターは、本発明のプロモーター遺伝子の下流に本発明のSLDHの大小サブユニットをそれぞれコードするDNAが機能的に配置されたベクター、より好ましくはチトクロームc様ポリペプチドをコードするDNAがさらに機能的に配置されたベクターである。特に好ましくは、各サブユニットDNAが、プロモーター側から小サブユニットDNA、大サブユニットDNA、チトクロームc様ポリペプチドDNAの順に配列されたベクターである。

本発明の形質転換体は、本発明のSLDHの各サブユニットをコードするDNAを含有する組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。宿主細胞は使用する組換えベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に限定されず、当分野で通常使用される天然に存在する細胞あるいは人工的に作製された変異体細胞もしくは組換え体細胞など種々の細胞が利用できる。好ましくは細菌、特に大腸菌（例えばDH5 α 、HB101等）、枯草菌、およびグルコノバクター属細菌等である。

組換えベクターの宿主細胞への導入は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、宿主が大腸菌や枯草菌等の細菌の場合には、Cohenらの方法 [Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [Mol. Gen. Genet., 168: 111 (1979)] およびコンピテント法 [J. Mol. Biol., 56: 209 (1971)] 等が挙げられる。

特に、本発明の形質転換体は、本発明のS L D Hをコードする大小サブユニットをそれぞれコードするDNAを機能的に含む発現ベクター、好ましくはチトクロームc様ポリペプチドをコードするDNAをさらに機能的に含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。より好ましくは、該DNAの発現を制御するプロモーターが本発明のプロモーター遺伝子である該発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。

- 10 該形質転換体がD-ソルビトールから2 K L G Aを製造することを目的として作製される場合、宿主細胞はL-ソルボースを2 K L G Aに変換する能力を有するものである必要がある。好ましくは、該宿主細胞はS D HおよびS N D H活性を有する細胞である。天然に存在するこのような細胞としては、例えばグルコノバクター属やアセトバクター属等に属する細菌、具体的にはグルコノバクター・
- 15 オキシダンスT 1 0 0等が挙げられる。また、人工的に作製されたこのような細胞としては、上記の天然に存在する細菌等から単離されたS D HおよびS N D HをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターで形質転換体された細胞が挙げられる。具体的には、E. coli JM109-pUC19SD5 (WO 94/20609 公報)、NB6939-pSDH-tufB1, NB6939-pSDH-trp6, NB6939-pSDH-PL1, NB6939-pSDH-tac8 (以上、WO
- 20 95/23220 公報) 等が例示される。

本発明のS L D Hは、上記のS L D HをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物からS L D Hを採取することにより製造することができる。

- 25 用いられる栄養培地としては、炭素源としてグルコース、フルクトースなどの糖類、グリセロール、好ましくはL-ソルボース、D-ソルビトールを含有するものである。また無機もしくは有機窒素源 (例えば、硫酸アンモニウム、塩化ア

ンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン、ビーフ抽出物等)を含んでいてもよい。さらに所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩(例えば、二リン酸ナトリウムまたは二リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム)、ビタミン類(例えば、ビタミンB1)、抗生物質(例えば、アンピシリン、カナマイシン)など〕を培地中に添加してもよい。好ましくは、D-ソルビトール、酵母エキス、 CaCO_3 、グリセロールを組成とする培地である。また、培地の糖(D-ソルビトール)の濃度は、通常1~50%、好ましくは2~30%、より好ましくは5~25%である。

- 10 形質転換体の培養は、通常pH5.5~8.5、好適にはpH7~7.5、18~40℃、好適には20~30℃で5~50時間で行われる。

S LDHの精製は、S LDH活性の存在する画分に応じて、通常使用される種々の分離技術を適宜組み合わせることにより行うことができる。

- 15 本発明のL-ソルボースの製造方法は、上記のS LDHをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物あるいはS LDH活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にD-ソルビトールを接触させることにより、L-ソルボースを生成させる。培養物にD-ソルビトールを接触させる方法には、D-ソルビトールを含有する培地中で該形質転換体を培養する方法も包含される。

- 20 本発明の2 KLGAの製造方法は、上記のS LDHをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターで形質転換された、L-ソルボースを2 KLGAに変換し得る宿主細胞を、適当な培地中で培養し、得られる培養物あるいはS LDH活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にD-ソルビトールを接触させることにより、2 KLGAを生成させる。培養物にD-ソルビトールを接触させる方法には、D-ソルビトールを含有する培地中で該形質転換体を培養する方法も包含される。
- 25

本発明のＬ－ソルボースの製造方法および２ＫＬＧＡの製造方法において用いられる培地および培養条件は、上記のＳＬＤＨの製造方法において用いられるものと同一であるかもしくは一部が異なるものでよい。

また、菌体抽出液にＤ－ソルビトールを接触させる場合には、培養終了後の培養物を遠心分離または濾過して菌体を回収し、これを適当な緩衝液、例えば酢酸緩衝液（約ｐＨ５）中に懸濁して、超音波処理等により菌体を破碎した後遠心処理して得られる上清を菌体抽出液として使用すればよい。

このようにして生産されたＬ－ソルボースまたは２ＫＬＧＡは、反応液（Ｄ－ソルビトールを含有する培地中で該形質転換体を培養する場合には培養上清）から一般に用いられる精製方法（例えば、透析、ゲル濾過、適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなど）を用いて精製することができる。

以下に本発明を具体的に説明するため実施例を示すが、本発明はこれら実施例によって何ら制限されるものではない。

15

実施例１ グルコノバクター・オキシダンスＩＦＯ３２５４からのソルビトールデヒドロゲナーゼの精製

（１）微生物

グルコノバクター・オキシダンスＩＦＯ３２５４株は財団法人発酵研究所（５
32-0024 日本国大阪市淀川区十三本町2-17-85）から入手した。

（２）グルコノバクター・オキシダンスＩＦＯ 3254の培養

グルコノバクター・オキシダンスＩＦＯ３２５４株のシングルコロニーを、5
00ml容量の三角フラスコ中の2.5%グルコース、1.0%ポリペプトン、
0.5%酵母抽出物（ディフコラボラトリーズ，USA）および2.0%CaC
O₃ からなる培地（各100ml×5）に植菌した。培養は30℃、250rpm
（5.0cm-throw）で18時間行った。培養終了後、培養液（全容量

500 ml) を4℃、6000 rpmで10分間遠心した。得られた細胞を冷生理食塩水で1回洗浄し、先と同じ条件で再び遠心した。

(3) 膜画分の調製

(2) で得られた細胞を20 mlの10 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し、超音波で破碎した。そして4℃、10,000 rpmで10分間遠心して上清を回収し、さらに4℃、32,000 rpmで60分間超遠心に付して細胞膜画分 (沈殿物) を得た。

(4) 膜画分からのSLDHの溶解

膜画分を10 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0, 6 ml) に懸濁し、Triton X-100を終濃度1%になるように添加して、氷冷下にて1.5時間静置した。得られた懸濁液を4℃、32,000 rpmで1時間超遠心して上清 (約5 ml) を回収し、これを可溶化SLDH画分とした。

(5) イオン交換クロマトグラフィー

可溶化SLDH画分 (2 ml) を、0.1% Triton X-100を含む25 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化したTSK gel DEAE-5PWカラム (7.5 mm内径×75 mm, 東ソー) を用いたイオン交換クロマトグラフィーに付し、該平衡緩衝液から0.25 Mの塩化カリウムを含む平衡緩衝液への直線グラジエントにて溶出した (流速: 1 ml/分, グラジエント時間: 45分)。溶出液は1.5分毎に分画した。全く同様にして二回の実験を行い、対応する画分を合わせた。酵素活性はフェリシアニド法 [Shinagawa ら, Agric. Biol. Chem., 46: 135-141 (1982); 660 nmの波長における吸光度の増加を指標とする] にて測定した。1分あたり1 μmolのD-ソルビトールの酸化を触媒する酵素の量を1ユニットと定義した。各画分のSLDH活性を測定し、活性が認められた画分 (画分10及び11) を合わせた。得られた画分を10 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して透析した後、透析液で平衡化したTSK gel CM-5PW (7.5 mm内径×75 mm, 東ソー) を用いたイオン

交換クロマトグラフィーに付し、該平衡緩衝液から0.2Mの塩化カリウムを含む平衡緩衝液への直線グラジエントにて溶出した（流速：1ml/分，グラジエント時間：40分）。溶出液は1.5分毎に分画し、ドデシル硫酸ナトリウム存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動〔12.5%SDS-PAGE；新

5 学実験講座（東京化学同人），1：330-387（1990）に準拠〕および酵素活性の測定を行った。SDS-PAGE分析の結果から、SLDH活性は62kDaと20kDaのタンパク質に対応しており、当該タンパク質が所望のSLDHの構成分子であると推測された（これらの値はShinagawaら，Agric. Biol. Chem.，46：135-141（1982）に報告されている値とよく一致している）。以下、この62kDa

10 および20kDaタンパク質をそれぞれ大サブユニットおよび小サブユニットと称する。

実施例2 SLDHの部分アミノ酸配列分析

TSK gel DEAE-5PWカラムクロマトグラフィーの活性画分（2ml）を小型限外濾過装置（Molecular LGC，ミリポア）を用いて約

15 180μlまで濃縮し、12.5%SDS-PAGEに付した。ゲル上で分離したタンパク質をポリビニリデンジフルオライド（PVDF）膜上にブロットした後、膜を0.1%ボンソーSを含む1%酢酸水で染色し、可視化された62kDaおよび20kDaタンパク質を含む膜をそれぞれ切り出して蒸留水で洗浄した。当該膜片を直接自動化プロテインシーケンサー・モデル470A（アプライド

20 バイオシステムズ）にかけて各サブユニットのN末端のアミノ酸配列を決定した。次に、内側の部分アミノ酸配列を決定するために、膜を0.5%ポリビニルピロリドンを含む100mM酢酸水に30分浸漬し、蒸留水で洗浄後、1mm角に裁断して8%アセトニトリルを含む25mM Tris-HCl（pH 8.0，200μl）に懸濁した。該懸濁液を15分間超音波処理し、1μgのリシルエンド

25 ペプチダーゼ（和光純薬）を加えて、37℃にて2時間インキュベートした後、1μgのリシルエンドペプチダーゼを追加して37℃にてさらに16時間イ

- ンキュベートした。得られた反応液を超音波処理して逆相HPLCに付した [カラム: Cosmosil 5C4-AR-300 (内径4.6mm×50mm, ナカライテスク); 溶出: 0.05%トリフルオロ酢酸中アセトニトリル8%から38%の直線グラジエント溶出 (30分); 検出器: 214nm]。大サブユニットより6種類のペプチド断片 (L1, L3, L4, L5, L6およびL7) を、小サブユニットより4種類のペプチド断片 (S1, S4, S5およびS6) を単離し、476A気相シーケンサー (アプライドバイオシステム) によりそれらのアミノ酸配列をそれぞれ決定した。その結果を表1に記す。

10 表1 SLDHの大小各サブユニットの部分アミノ酸配列

(1) 大サブユニット

| ペプチド | アミノ酸配列 | (配列表配列番号) |
|--------|---|-----------|
| N末(LN) | SSSNSLSADVIVGX ¹⁾ (G) ²⁾ VA(D)(A) | (12) |
| L1 | TNYXVVHBPQARNTRPYDK | (13) |
| L3 | VVAVNWD PDK | (14) |
| L4 | EVPLSYGADQFRK | (15) |
| L5 | DVLGIPHPBVWK | (16) |
| L6 | ELBEQIRYGSSHAVRLFSHNBGIADPDNRL | (17) |
| L7 | ELMALMSGTDPQWTK | (18) |

(2) 小サブユニット

| ペプチド | アミノ酸配列 | (配列表配列番号) |
|--------|-----------------------|-----------|
| N末(SN) | EBAKIPLASRDBYIRFFBVX | (19) |
| S1 | BFSXAAEFARBAEHXD NALK | (20) |
| S4 | SPLASRDBYBRFFEVR(R)LM | (21) |
| S5 | TYATARPFYWTEKPPVVETP | (22) |
| S6 | SPLASRDEYERFFBVSRRML | (23) |

¹⁾X: 未同定のアミノ酸

15 ²⁾(): 不確定のアミノ酸

実施例3 DNAプローブの調製

(1) DNAオリゴマーの合成

DNAシンセサイザー モデル392 (アプライドバイオシステムズ) を用いたホスホアミダイト法によって、大サブユニットの部分アミノ酸配列に対応する塩基配列からなる種々のオリゴヌクレオチドを合成した(表2)。合成されたオリゴヌクレオチドを28%アンモニア水でCPGポリマー担体(CPG: controlled pore glass)から脱離し、60℃で9時間加熱して全保護基を外した。該反応混液から溶媒を真空下で減圧留去し、残渣を200 μ lのTE緩衝液[10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA]に溶解した。得られた溶液をエーテルで1回洗浄し、エタノールで沈澱させた。沈澱により得られたオリゴヌクレオチドをそのままPCRに用いた。

表2 PCR用プライマーとして合成されたSLDH大サブユニット部分
アミノ酸配列をコードする塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

| プライマー | 塩基配列 ¹⁾ | (配列表配列番号) |
|--------------------|------------------------|-----------|
| L4-F ²⁾ | GGN GCN GAY CAR TTY MG | (24) |
| L4-R ²⁾ | CK RAA YTG RTC NGC NCC | (25) |
| L5-F | CAY CCN GAR GTN TAY TA | (26) |
| L5-R | TA RTA NAC YTC NGG RTG | (27) |
| L6-F | GAR GAR CAR ATH CGN TA | (28) |
| | GAR GAR CAR ATH AGR TA | (29) |
| L6-R | TA NCG DAT YTG YTC YTC | (30) |
| | TA YCT DAT YTG YTC YTC | (31) |
| L7-F | ACN GAY CCN CAR TGG AC | (32) |
| L7-R | GT CCA YTG NGG RTC NGT | (33) |
| LN-F | GAY GTB GTV ATH GTB GG | (34) |

¹⁾M: AまたはC, R: GまたはA, Y: TまたはC, K: GまたはT, V: A, GまたはC

H: A, CまたはT, D: A, GまたはT, B: G, CまたはT, N: A, C, GまたはT

²⁾L4-F(R)は表1のL4のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するフォワード(リバース)プライマーを意味する(他の同様)

(2) PCR反応

表2に示したプライマーのすべての組み合わせについて、グルコノバクター・オキシダンス IFO 3254 株由来のゲノミックDNAを鋳型とするPCR反応を行った。反応混液[PCR緩衝液中、ゲノミックDNA 180 ng, プライマー各 2.5 pmol, dNTP 各 200 μ M および Taq DNAポリメラーゼ(パーキンエルマー・シータス社) 2.5 ユニット]を含むマイクロチューブをハイバイドサーマルリアクター(モデルHB-TR1; ハイバイド社, イギリス)にセットし、1サイクル: 95 $^{\circ}$ C, 0.5分間(変性)、55 $^{\circ}$ C, 1分間(アニーリング) および 72 $^{\circ}$ C, 2分間(伸長) からなるPCR反応を30サイクル実施した。すべての組み合わせの中で、LN-FとL4-Rのプライマーを用いたPCR反応液を2.0%アガロースゲル電気泳動すると、約500bpの特異的な増幅断片のバンドが検出された。該増幅断片を含むゲル部分を切り出し、精製カラムを用いてDNA断片を精製した。得られたDNAとpGEM-T(プロメガ社)をT4DNAリガーゼ(宝酒造)を用いて連結し、Maniatisら[Molecular Cloning, 2nd ed., Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, USA]に記載の方法に従って該連結物で*E. coli* DH10Bを形質転換した。該形質転換体の1つから所望のプラスミドpSLD-1を取得して制限酵素マッピングにより特性を調べ、次いで挿入DNAの塩基配列を決定した。その結果、当該DNAは531bp(配列表配列番号2中、塩基番号24~554に相当)からなり、3'及び5'末端にはPCRで用いたプライマーの配列が見いだされた。さらに、プライマーにつながる内部配列にコードされているアミノ酸配列は精製したSLDHの大サブユニットの部分アミノ酸配列と一致した。

(3) ディゴキシゲニン(DIG)ーラベル化プローブの調製

pSLD-1をSphIおよびPstI(ニッポンジーン)で消化し、0.5%アガロースゲル電気泳動によりインサートDNAを分離回収した。得られたDNA断片をDIGラベリングキット(ベーリンガー・マンハイム)を用いて添付のプ

ロトコールに従ってDIGラベル化した。

実施例4 グルコノバクター・オキシダンスIFO3254のDNAライブラリー
ーからのSLDH遺伝子の単離

(1) 染色体DNAライブラリーの調製

5 グルコノバクター・オキシダンスIFO3254株のシングルコロニーを、2%
グルコース、1%ポリペプトンおよび0.5%酵母抽出物からなる培地(80ml)
中で37℃、24時間培養した。培養終了後、菌体を遠心(4,600rpm,10分間)により回収し、生理食塩水2mlに懸濁した。該懸濁液をSTE
緩衝液[20%スクロース,50mM Tris-HCl(pH8),1mM E
10 DTA]2mlで希釈し、リゾチーム3mgと混合して37℃、30分間インキュ
ベートした。サルコシル溶液[1%ラウロイルサルコシレート,100mM E
DTA(pH9.0)]50mlおよびプロテイナーゼK(終濃度100μg/ml)
を添加した後、該混合液を50℃で1.5時間インキュベートした。塩化セ
シウム11gおよび5mg/mlエチジウムブロミド0.6mlを該混合液に溶
15 解し、20℃、50,000rpmで15時間超遠心した。染色体DNAを含有
する部分を単離し、生理食塩水飽和-イソプロピルアルコールで2回洗浄した後、
TE緩衝液2Lで4時間透析した。該透析物をフェノール20mlで抽出し、2
LのTE緩衝液で2回透析して所望の染色体DNA溶液(20ml,56μg/ml)
を得た。該染色体DNAをSau3AIで部分消化し、得られたフラグメン
20 トをショ糖密度勾配にて分離し、8~20kbpのサイズを中心とするフラグ
メントを取得し、ラムダファージベクターEMBL-3(プロメガ社)のBam
HI部位にクローニングした。大腸菌LE392を指示菌とするタイターチェッ
クによりライブラリーのサイズは 1.5×10^5 クローンであった。

(2) プラークハイブリダイゼーション

25 平板固定化細菌として*E. coli* NM538(プロメガ社)を用いたラム
ダファージプラークの調製および該プラークのニトロセルロースフィルター上へ

の固定化を、Maniatis ら[Molecular Cloning, 2nd ed., Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, USA]に記載の方法に従って実施した。ラムダDNAを含むフィルターをハイブリダイゼーション緩衝液（50%ホルムアミド、0.2%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%フィコール、5×SSC、0.1%SDS、50 μ g/mlサケ精子DNA）中で42℃、4時間インキュベートし、DIGラベル化プローブ（531bp、50ng/ml）を含む同緩衝液中で42℃にて18時間、次に0.05%SDSを含む2×SSC中、42℃でインキュベートして過剰のプローブを除去した。該フィルターをディテクションキット（ベーリンガー・マンハイム社）を用いて検出し、最終的に5個のポジティブクローンを得た。

(3) サザンブロットニング

ポジティブクローン（#1）からファージDNAを抽出し、BamHIとSalI（ニッポンジーン）で消化して0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。ゲル上で分離されたDNAフラグメントをエレクトロブロットニングによりニトロセルロースフィルター上にトランスファーし、上記のDIGラベル化プローブを用いてサザンロットを行った。その結果、約1kbpのDNAフラグメントがDIGラベル化プローブとハイブリダイズした。

実施例5 SLDH遺伝子のDNA配列分析

(1) ラムダファージ（#1）DNAシーケンス用のプラスミドの構築

ラムダファージ（#1）のDNAを制限酵素BamHIおよびSalIで消化し、BamHI/BamHI（4.4kb）、BamHI/SalI（1.0kb）およびSalI/SalI（1.3kb）断片を得た。これらのDNAをpUC18/19にそれぞれサブクローニングしてpSLD-4、pSLD-2およびpSLD-3を得た。pSLD-4はさらにHindIIIで処理して1.3kbのインサートDNA断片を得、同様にpUC18/19にサブクローニングしてpSLD-5を作製した。

(2) DNA配列分析

鋳型DNA (pSLD-5, pSLD-2およびpSLD-3) のDNA配列分析を、370A DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ) を用いてダイデオキシターミネーション法により添付のプロトコールに従って行った。

- 5 M13シーケンシングプライマーであるユニバーサルプライマーおよびリバープライマー (New England Biolabs, USA) を用いて、最初のシーケンシングを行った。また、表3に記載する合成オリゴヌクレオチドを用いてさらなる分析を行った。

10 表3 ラムダファージ#1インサートDNAのシーケンス用プライマー

| プライマー | 塩基配列 | (配列表配列番号) |
|-------|-------------------|-----------|
| SL-1 | TATCTGCATACGACC | (35) |
| SL-2 | GAAGTCATGATGGGC | (36) |
| SL-3 | TGCATACGACCGGACC | (37) |
| SL-4 | TTGGCACTCTCAATGC | (38) |
| SL-5 | TCTGGGCATTCTCAGCC | (39) |
| SL-6 | CGGTGTGATGGGAGC | (40) |
| SL-7 | GACGACTGTCTGAGCC | (41) |
| SL-8 | CCAAGGCCATGATGCG | (42) |
| SL-9 | CGAGCACCTAATTCC | (43) |
| SL-10 | CTGATCATCATTGCG | (44) |
| SL-11 | CCGATGAGAGGATGG | (45) |
| SL-12 | ATTCGGTCGTTGACG | (46) |
| SL-13 | GCTGTTGAACATAGC | (47) |
| SL-14 | CTGCATTGAGAGAGTGC | (48) |

- 約3780bpの塩基配列を決定した結果、2個のORFが見いだされた。最初のORF (ORF1; 配列表配列番号7中、塩基番号681~1274) は594bpからなり、SLDHの小サブユニットのN末端および内部部分アミノ酸配列に対応するDNA配列を含んでいた。アミノ酸配列分析と塩基配列の比較から、ORF1は41アミノ酸からなるリーダー配列を含む小サブユニット前駆体
- 15

(197アミノ酸；配列表配列番号3)をコードしていることが分かった。2番目のORF (ORF 2；配列表配列番号7中、塩基番号1293～2930)は1638bpからなり、大サブユニット[545アミノ酸(開始メチオニンを含む)；配列表配列番号1]をコードしていた。また、ORF 2の直後にチトクロームc様ポリペプチドの一部をコードしていると推定される塩基配列が見出されたが、完全長のコード領域を含むものではなかった。

(3) ラムダファージ(#1) DNAシーケンス用のプラスミドの構築

そこで、別のポジティブクローン(#7)から同様にしてラムダDNAを抽出し、このDNAをSalI消化して4.0kbpおよび7.6kbpのSalI/SalI断片を得た。前者をpHSG298に、後者をpBlueScript IIKS(+)にそれぞれサブクロニングして、pSD37RおよびpBL7Sal7を得た(第2図)。

(4) DNA配列分析

鋳型DNA(pSD37RおよびpBL7Sal7)のDNA配列分析を、370A DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ)を用いてダイデオキシターミネーション法により添付のプロトコールに従って行った。M13シーケンシングプライマーであるユニバーサルプライマーおよびリバースプライマー(New England Biolabs, USA)を用いて、最初のシーケンシングを行った。また、表4に記載する合成オリゴヌクレオチドを用いてさらなる分析を行った。

表4 ラムダファージ#7インサートDNAのシーケンス用プライマー

| プライマー | 塩基配列 | (配列番号) | 存在位置 ¹⁾ |
|-------|-------------------|--------|-----------------------------|
| SLY-1 | GTACCTGCGTACAGGC | (49) | 3666-3681 |
| SLY-2 | GTTGCCAGATCAGCGG | (50) | 2817-2832 |
| SLY-3 | CTCCGAATAGGCCGTG | (51) | 3273-3288 (R) ²⁾ |
| SLY-4 | TGATCGCACGACGAATG | (52) | 4065-4081 |
| SLY-5 | GTGCACCGACTACTGC | (53) | 4009-4024 (R) |

| | | | |
|--------|---------------------|------|---------------|
| SLY-6 | GCAGTAGTCGGTGAC | (54) | 4009-4024 (R) |
| SLY-7 | ACAGCACATCTTAGGTTTC | (55) | 180-197 |
| SLY-8 | CAACGAACTTGCGAGAG | (56) | 1364-1380 |
| SLY-9 | GATCGCGTGGAGATCC | (57) | 3759-3774 (R) |
| SLY-10 | CACGGCCTATTCGGAG | (58) | 3273-3288 (R) |
| SLY-11 | GTTTCATGAACACGCAGG | (59) | 4692-4708 |
| SLY-12 | CGAAGAATGGCOATACC | (60) | 4641-4657 (R) |
| SLY-13 | TGGATTCGTGACGGGC | (61) | 5149-5164 (R) |
| SLY-14 | CCGATGAAGGAAGTACC | (62) | 1806-1822 |
| SLY-15 | CTTCCGCATGATTGACC | (63) | 2000-2016 (R) |

¹⁾存在位置は配列表配列番号4の塩基番号で示す

²⁾(R)は相補鎖配列であることを示す

塩基配列の解析により、3番目のORF (ORF 3 ; 配列表配列番号7中、塩
5 基番号2923～4359) は1437bpからなり、チトクロームc様のポリ
ペプチド [478アミノ酸 ; 配列表配列番号5] をコードしていることが明らか
となった。ORF 3の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列について、
データベース (GenBank, SWISS-PROT) 上でホモロジー検索し
た結果、塩基配列においてグルコノバクター・サブオキシダンスIFO1252
10 8株由来チトクロームc-553遺伝子と51.6%、アミノ酸配列においてア
セトバクター・ポリオキシゲネス由来アルコールデヒドロゲナーゼのチトクロ
ームcサブユニット前駆体と36.2%のホモロジーを有することが判明した。さ
らに、該チトクロームc様ポリペプチドには、アセトバクター・ポリオキシゲ
ネスにおいて報告されている3カ所のヘム結合部位コンセンサス配列 Cys Xaa Xaa
15 Cys His (配列表配列番号11) が保存されていた (配列表配列番号5中、アミノ
酸番号50～54, 197～201および340～344)。

また、ORF 1の上流の塩基配列 (配列表配列番号7中、塩基番号1～680)
の解析の結果、ORF 1の開始コドンより約10～20bpほど上流にSD配列
に相当すると見られる配列が見出された。さらに、該開始コドンより約100～

- 130bpほど上流の塩基配列中に原核プロモーターの-35領域および-10領域に相当すると見られる配列が見出された。また、ORF3の終止コドンより約15~50bpほど下流に原核細胞の転写終結シグナルに共通して見られる配列が見出された。したがって、ラムダファージ#7のインサートDNAは、SLDHの小サブユニット前駆体、大サブユニットおよびチトクロームc様ポリペプチドをそれぞれコードする領域およびそれらをポリシストロニックに発現させるプロモーター領域およびターミネーター領域からなる完全な遺伝子群発現ユニットを含有することが明らかとなった。SLDH遺伝子群の構成を表5にまとめた。

10

表5 SLDH遺伝子群の構成

| サブユニット | 塩基対数(bp) ¹⁾ | アミノ酸数 | 分子量 |
|-----------|------------------------|-------------------|----------------------|
| プレ小サブユニット | 594 | 197 ²⁾ | 22,274 ³⁾ |
| 成熟小サブユニット | 471 | 156 | 17,670 |
| 大サブユニット | 1,638 | 545 ²⁾ | 60,076 ³⁾ |
| チトクロームc | 1,437 | 478 ²⁾ | 51,096 ³⁾ |

¹⁾開始および終止コドンを含む²⁾開始メチオニンを含む³⁾開始メチオニンを含めたアミノ酸配列から導かれる計算値

15 実施例6 大腸菌中でのSLDH遺伝子の発現

(1) 発現ベクターの構築

- 実施例5にて調製したpSD37RをSalIとHindIIIで消化し、2.4kbの断片を単離した。また、pBL7Sal7をSalIとBamHIで消化し、2.4kbの断片を単離した。両断片を、予めHindIIIとBamHIで消化したpUC18の2.8kb断片とライゲーションさせてSLDHの全遺伝子発現ユニットを含む発現ベクターpSLDH3を得た(以上の構築の模式図を第3図に示す)。該発現ベクターで常法に従って大腸菌DH10Bを形質転換

20

した。

(2) 形質転換された大腸菌の培養

(1) で得られた形質転換体 (*E. coli* DH10B/pSLDH3) の
シングルコロニーを100mlのL-Amp培地 [1%バクトトリプトン (ディ
5 フコラボラトリーズ), 0.5%酵母抽出物, 0.5%塩化ナトリウムおよび50
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン (pH7.2)] に植菌し、37℃で18時間培養した。
得られた培養物から5mlをとり、500mlのL-Amp培地に移して37℃
で7時間培養した。該培養液を6,000rpmで10分間遠心して菌体を回収
した。得られた菌体を0.85%食塩水で洗浄し、10mM酢酸緩衝液 (pH5.
10 0) 20mlに懸濁して、30秒間隔で各1分ずつ計3回超音波処理を行い細胞
を破碎した。得られた細胞破碎液を10,000rpmにて10分遠心して上清
を回収した。

(3) 分画

(2) で得られた細胞破碎上清12.5mlを32,000rpmにて1時間
15 超遠心して上清を回収し、「細胞質画分」とした。残渣を可溶化用緩衝液 [1% T
riton X-100, 0.1M KCl, 0.1M D-ソルビトールを含
む10mM酢酸緩衝液 (pH5.0)] 5mlに懸濁し、氷冷下で2時間振とうし
た。該懸濁液を32,000rpmにて1時間超遠心して上清を回収し、「膜画分」
とした。

(4) SLDH活性の測定

SLDH活性は、Agirc. Biol. Chem., 46: 135-141 (1982)およびMethods in
Enzymology, Vol. V, 287-291 (1962) に記載された方法に準じて測定した。すな
わち、100mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.1mlおよび0.1% Triton
X-100を含むMcIlvaine緩衝液 (0.1Mクエン酸, 0.2M Na_2
25 HPO_4 , pH4.5) 0.5ml、1M D-ソルビトール0.1mlおよび
試料溶液 (細胞破碎液、100℃加熱した細胞破碎液、細胞質画分または膜画分)

0.3 ml を混和し、25℃でインキュベートした。次いで、ferric-D
upanol 試薬 [$\text{FeSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 1.25 g, SDS 0.75 g およびリ
ン酸 23.75 ml に蒸留水を加えて 250 ml にした溶液] 0.5 ml と蒸留
水 3.5 ml を加え、660 nm における吸光度を測定した。対照として pUC
5 18 で形質転換された大腸菌 DH10B の培養物を同様に処理して得られる各画
分を用いた。なお、1 分間に 1 μmol の D-ソルビトールを酸化する酵素量を
1 ユニットと定義した。測定の結果を表 6 に示す。組換え大腸菌 DH10B/p
SLDH3 の細胞質画分に高い SLDH 活性が検出された。

10 表6 SLDHの全遺伝子発現ユニットを含む形質転換体培養物の
種々の画分中のSLDH活性

| プラスミド | 画分 | 酵素活性(U/ml) | 比活性($\mu\text{U}/\text{mg}$) |
|-------|---------------|------------|--------------------------------|
| pUC18 | 細胞破碎液 | 43 | 51 |
| | 細胞破碎液(100℃加熱) | 5.6 | 6.7 |
| | 細胞質画分 | 26 | 58 |
| | 膜画分 | 0.93 | ND ¹⁾ |
| SLDH3 | 細胞破碎液 | 1300 | 51 |
| | 細胞破碎液(100℃加熱) | 30 | 1500 |
| | 細胞質画分 | 340 | 1000 |
| | 膜画分 | 3.7 | ND |

¹⁾ND: 検出されなかった

産業上の利用可能性

15 本発明の SLDH をコードする遺伝子群を含む発現ベクターで L-ソルボース
を 2KLG A に変換する能力を有する細胞を形質転換すれば、得られる形質転換
体の一連の培養操作によって、D-ソルビトールから 2KLG A を簡単かつ大量
に製造することができる。ひいては、L-アスコルビン酸の製造工程を大幅に簡
略化することが可能となる。

配列リストのフリーテキスト

配列番号：8

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットのN末端配列。

配列番号：9

5 D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの小サブユニットのN末端配列。

配列番号：10

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼのチトクロームc様サブユニットのN末端配列。

配列番号：11

10 存在位置：(1)... (5)

ヘム結合部位のコンセンサス配列。

存在位置：(2)

任意のアミノ酸。

存在位置：(3)

15 任意のアミノ酸。

配列番号：12

未同定のアミノ酸。

配列番号：13

未同定のアミノ酸。

20 配列番号：19

未同定のアミノ酸。

配列番号：20

存在位置：(4)

未同定のアミノ酸。

25 存在位置：(15)

未同定のアミノ酸。

配列番号：21

未同定のアミノ酸。

配列番号：24

存在位置：(3)

5 A, G, T又はC。

存在位置：(6)

A, G, T又はC。

10 D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのフォワードプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：25

存在位置：(12)

A, G, T又はC。

存在位置：(15)

15 A, G, T又はC。

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのリバースプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：26

20 存在位置：(6)

A, G, T又はC。

存在位置：(12)

A, G, T又はC。

25 D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのフォワードプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号： 2 7

存在位置： (6)

A, G, T又はC。

存在位置： (12)

5 A, G, T又はC。

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのリバースプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号： 2 8

10 存在位置： (15)

A, G, T又はC。

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのフォワードプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

15 配列番号： 2 9

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのフォワードプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号： 3 0

20 存在位置： (3)

A, G, T又はC。

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのリバースプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

25 配列番号： 3 1

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部

分ヌクレオチド配列を増幅するためのリバースプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：32

存在位置：(3)

5 A, G, T又はC。

存在位置：(9)

A, G, T又はC。

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのフォワードプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：33

存在位置：(9)

A, G, T又はC。

存在位置：(15)

15 A, G, T又はC。

D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのリバースプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：34

20 D-ソルビトールデヒドロゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAの部分ヌクレオチド配列を増幅するためのフォワードプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：35

25 ラムダファージ#1のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：36

ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：37

5 ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：38

ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：39

10 ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：40

ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

15 配列番号：41

ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：42

20 ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：43

ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：44

25 ラムダファージ# 1 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：45

ラムダファージ#1のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：46

- 5 ラムダファージ#1のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：47

ラムダファージ#1のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

- 10 配列番号：48

ラムダファージ#1のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：49

- 15 ラムダファージ#7のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：50

ラムダファージ#7のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：51

- 20 ラムダファージ#7のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：52

ラムダファージ#7のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

- 25 配列番号：53

ラムダファージ#7のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働く

くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：5 4

ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

5 配列番号：5 5

ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：5 6

10 ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：5 7

ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：5 8

15 ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：5 9

ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

20 配列番号：6 0

ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：6 1

25 ラムダファージ# 7 のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：6 2

ラムダファージ#7のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：63

- 5 ラムダファージ#7のインサートDNAのシーケンス用プライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

本出願は日本国で出願された平成9年特許願第285280号を基礎としており、そこに開示される内容は本明細書に全て包含されるものである。

- 10 また、ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物は、引用によりそれらの内容の全てが本明細書に組み込まれるものである。

請求の範囲

1. 下記の性質を有するポリペプチド。

(1) 分子量：約 62 kDa (SDS-PAGE), 約 60 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

5 (2) N末端側のアミノ酸配列が Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly Val Ala Gly Ala または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

(3) 下記の性質を有するポリペプチドと複合体を形成してD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る

10 (a) 分子量：約 20 kDa (SDS-PAGE), 約 18 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

(b) N末端側のアミノ酸配列が Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Ser または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

15 2. 下記の性質を有するポリペプチド。

(1) 分子量：約 20 kDa (SDS-PAGE), 約 18 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

20 (2) N末端側のアミノ酸配列が Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Ser または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

(3) 下記の性質を有するポリペプチドと複合体を形成してD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る

(a) 分子量：約 62 kDa (SDS-PAGE), 約 60 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

25 (b) N末端側のアミノ酸配列が Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly Val Ala Gly Ala または該アミノ酸配列において1個もしくは

数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である

3. 下記の性質を有するポリペプチド。

(1) チトクローム c 活性を有する

(2) 分子量：約 51 kDa (アミノ酸配列に基づく計算値)

- 5 (3) N末端側のアミノ酸配列が Met Arg Glu Gly Asn Lys Ala Gly Ile Arg Arg Leu Phe Leu Pro Ala Ala Ile Ala Ser または該アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列であり、且つ3カ所のヘム結合部位コンセンサス配列 (Cys Xaa Xaa Cys His) を含む

- 10 4. グルコンバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) IFO 3254 株由来である請求の範囲1～3のいずれかのポリペプチド。

5. 請求の範囲1のポリペプチドおよび請求の範囲2のポリペプチドを含んでなり、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質。

- 15 6. さらに請求の範囲3のポリペプチドを含んでなる請求の範囲5のオリゴマー蛋白質。

7. 以下の(a)又は(b)のポリペプチド。

(a) 配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ以下の(c)又は

- 20 (d) のポリペプチドとともにD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質を形成することができるポリペプチド

(c) 配列表配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) 配列表配列番号3に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

- 25 8. 以下の(a)又は(b)のポリペプチド。

(a) 配列表配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

- (b) 配列表配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ以下の(c) 又は(d) のポリペプチドとともに D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質を形成することができるポリペプチド
- 5 (c) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (d) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド
9. 以下の(a)又は(b)のポリペプチド。
- (a) 配列表配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
- 10 (b) 配列表配列番号 5 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つチトクローム c 活性を有するポリペプチド
10. グルコノバクター属に属する細菌由来である請求の範囲 7～9 のいずれかのポリペプチド。
- 15 11. 請求の範囲 7 のポリペプチドおよび請求の範囲 8 のポリペプチドを含んでなり、D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質。
12. さらに請求の範囲 9 のポリペプチドを含んでなる請求の範囲 11 のオリゴマー蛋白質。
- 20 13. 請求の範囲 8 のポリペプチドをコードする DNA。
14. 以下の(a)または(b)の DNA である請求の範囲 13 の DNA。
- (a) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA
- (b) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA
- 25 15. 請求の範囲 9 のポリペプチドをコードする DNA。
16. 以下の(a)または(b)の DNA である請求の範囲 15 の DNA。

- (a) 配列表配列番号 4 に示される塩基配列中塩基番号 1 2 4 ~ 5 9 1 で示される塩基配列からなる DNA
- (b) 上記 (a) の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA
- 1 7. 以下の (a) または (b) の DNA である請求の範囲 1 6 の DNA。
- 5 (a) 配列表配列番号 4 に示される塩基配列中塩基番号 1 ~ 5 9 1 で示される塩基配列からなる DNA
- (b) 上記 (a) の塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる DNA
- 1 8. 請求の範囲 1 0 のポリペプチドをコードする DNA。
- 10 1 9. 以下の (a) または (b) の DNA である請求の範囲 1 8 の DNA。
- (a) 配列表配列番号 6 に示される塩基配列からなる DNA
- (b) 配列表配列番号 6 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA
- 2 0. グルコノバクター属に属する細菌由来である請求の範囲 1 3 ~ 1 9 のいずれかの DNA。
- 15 2 1. 以下の (a) または (b) の DNA からなるプロモーター遺伝子。
- (a) 配列表配列番号 7 に示される塩基配列中塩基番号 1 ~ 6 8 0 で示される塩基配列からなる DNA
- (b) 上記 (a) の塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、且つ微生物においてプロモーター活性を有する DNA。
- 20 2 2. グルコノバクター属に属する細菌由来である請求の範囲 2 1 のプロモーター遺伝子。
- 2 3. 請求の範囲 1 3 ~ 2 0 のいずれかの DNA を含む組換えベクター。
- 2 4. 請求の範囲 1 3 の DNA および請求の範囲 1 5 の DNA を機能的に含む発現ベクター。
- 25 2 5. さらに請求の範囲 1 8 の DNA を機能的に含む請求の範囲 2 4 の発現ベク

ター。

26. 請求の範囲21または22のプロモーター遺伝子を含む発現ベクター。

27. 請求の範囲13のDNAおよび請求の範囲15のDNAが該プロモーター遺伝子の下流に機能的に配置される請求の範囲26の発現ベクター。

5 28. さらに請求の範囲18のDNAが該プロモーター遺伝子の下流に機能的に配置される請求の範囲27の発現ベクター。

29. 請求の範囲23～28のいずれかのベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

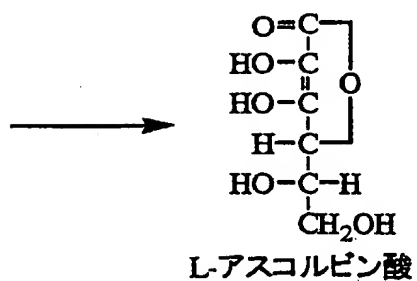
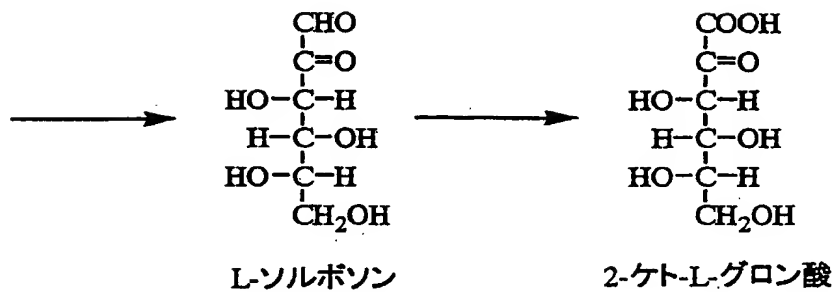
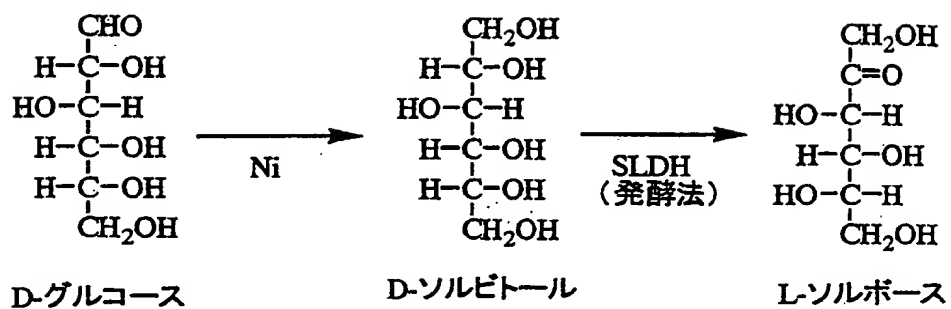
10 30. 該宿主細胞がL-ソルボースを2-ケトーL-グロン酸に変換する能力を有するものである請求の範囲29の形質転換体。

31. 請求の範囲24, 25, 27または28のいずれかの発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物からD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得るオリゴマー蛋白質を採取することを含む該オリゴマー蛋白質の製造方法。

15 32. 請求の範囲24, 25, 27または28のいずれかの発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含むL-ソルボースの製造方法。

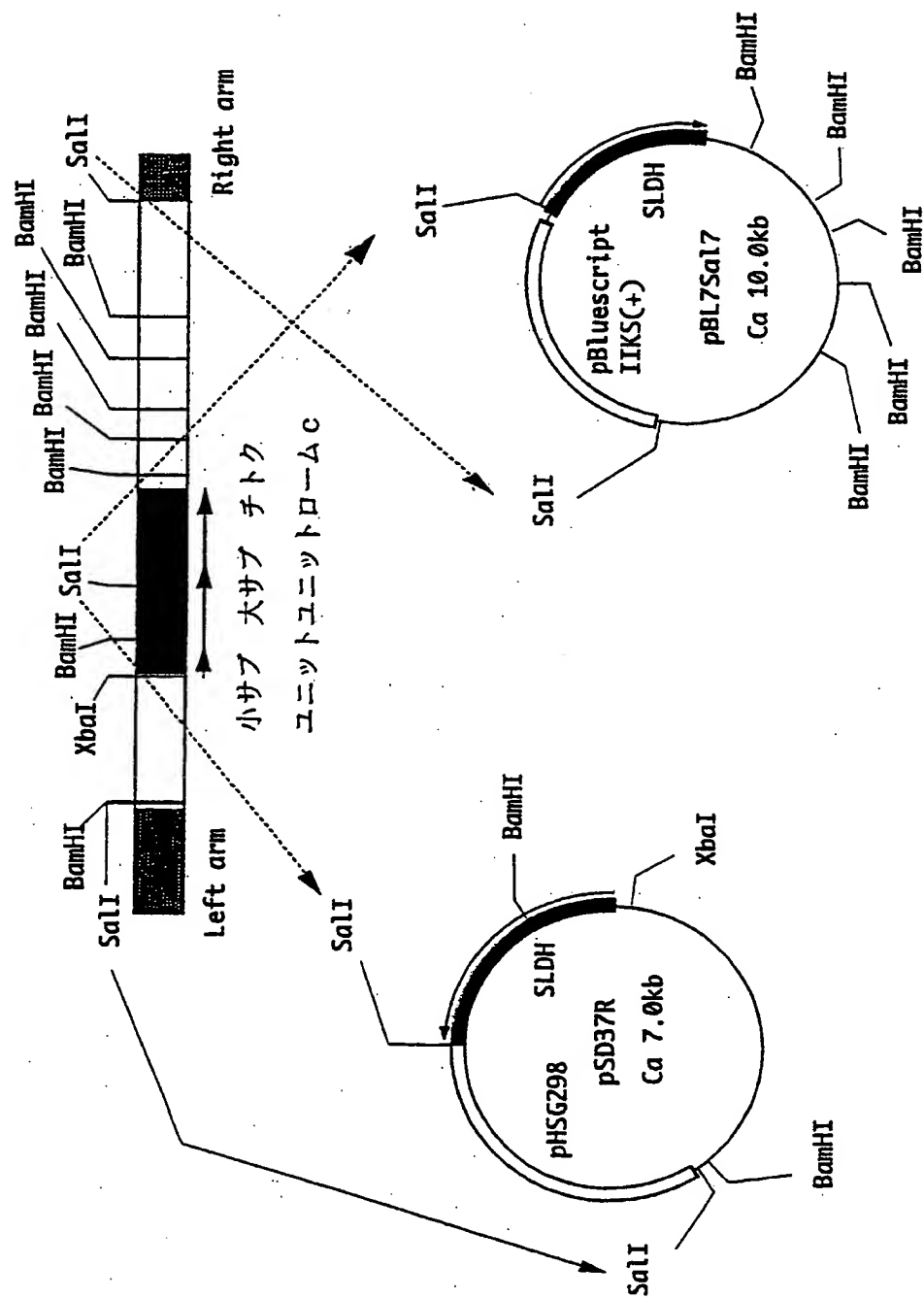
20 33. 請求の範囲24, 25, 27または28のいずれかの発現ベクターで形質転換されたL-ソルボースを2-ケトーL-グロン酸に変換する能力を有する宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含む2-ケトーL-グロン酸の製造方法。

第 1 図

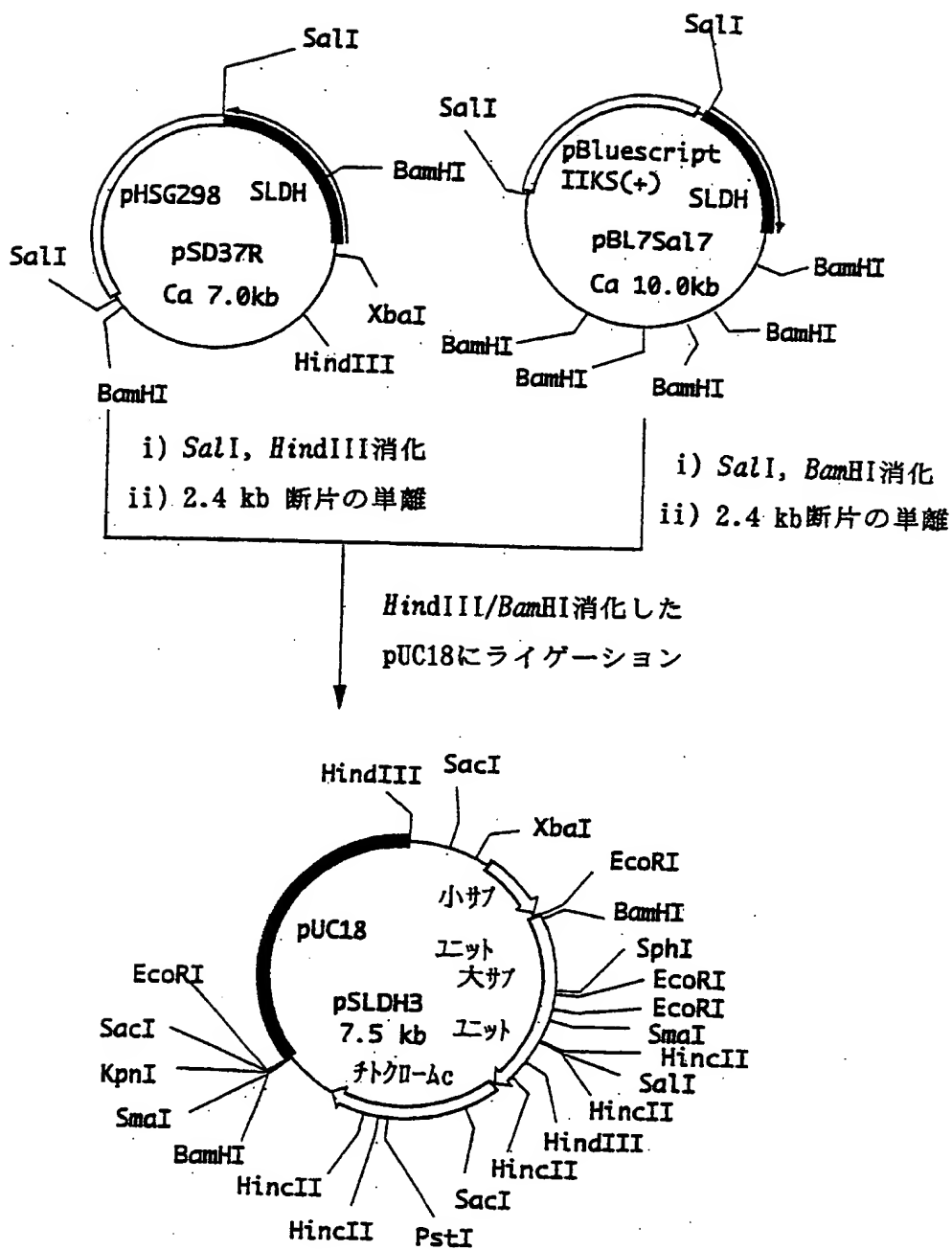


第 2 図

ラムダファージクロン#7



第 3 図



配列表

SPECIMEN SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> D-sorbitol Dehydrogenase, Gene thereof and Use thereof

<130> 09280

<150> JP 9-285280

<151> 1997-10-17

<164> 63

<210> 1

<211> 544

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 1

```

Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly
 1           5           10           15
Val Ala Gly Ala Ser Ile Ala Asn Glu Leu Ala Arg Ala Gly Leu Ser
      20           25           30
Val Ile Val Leu Glu Ala Gly Pro Arg Ile Asp Arg Gln His Ile Leu
      35           40           45
Glu Asn Phe Arg Thr Thr Glu Asn Lys Gly Ala Tyr Gln Leu Pro Tyr
      50           55           60
Pro Pro Val Pro Trp Ala Met His Pro Pro Asp Gln Gly Ser Pro Asn
      65           70           75           80
Gly Tyr Leu His Thr Thr Gly Pro Asp Gly Ala Ala Tyr Gln Gln Gly
      85           90           95
Tyr Leu Arg Val Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Gly Cys Ala
      100          105          110
Trp Arg Tyr Leu Pro Ser Asp Phe Glu Leu His Ser Arg Tyr Gly Val
      115          120          125
Gly Arg Asp Trp Ala Ile Lys Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Phe Tyr Tyr
      130          135          140
Gln Ala Glu Val Met Met Gly Val Ala Gly Pro Asn Met Asp Val Asp
      145          150          155          160
Asp Leu Gly Ser Pro Arg Ser His Asn Tyr Pro Met Lys Glu Val Pro
      165          170          175
Leu Ser Tyr Gly Ala Asp Gln Phe Arg Lys Leu Ile His Glu Lys Thr
      180          185          190
Asn Tyr Arg Val Val His Glu Pro Gln Ala Arg Asn Thr Arg Pro Tyr
      195          200          205

```

2/30

```

Asp Lys Arg Pro Thr Cys Glu Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys
 210                      215                      220
Pro Ile Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile His Ser Val Asn His Ala Glu
225                      230                      235                      240
Ala Ala Gly Ala Arg Ile Ile Pro Asn Ala Val Val Tyr Arg Leu Glu
                      245                      250                      255
Thr Asp Ala Ser Asn Lys Lys Val Val Pro Val Asn Tyr Tyr Asp Pro
                      260                      265                      270
Asp Lys Asn Ser His Arg Val Thr Gly Lys Phe Phe Val Val Ala Ala
                      275                      280                      285
His Cys Ile Glu Ser Ala Lys Leu Leu Leu Leu Ser Ala Asp Asp Lys
                      290                      295                      300
Asn Pro Arg Gly Ile Ala Asn Ser Ser Asp Gln Val Gly Arg Asn Met
305                      310                      315                      320
Met Asp His Thr Gly Val Gln Leu Ser Phe Met Ser Gly Asn Asp Ser
                      325                      330                      335
Leu Trp Pro Gly Arg Gly Pro Leu Leu Thr Ser Ile Ile Asp Ser Phe
                      340                      345                      350
Arg Asp Gly Pro Trp Arg Ser Glu Arg Gly Ala Tyr Leu Val His Met
                      355                      360                      365
Val Asp Asp Asn Gln Val Asp Phe Ala Thr Gly Leu Ala Ile Ala Lys
                      370                      375                      380
Gly Tyr Val Gly Lys Glu Leu Glu Glu Gln Ile Arg Tyr Gly Ser Ser
385                      390                      395                      400
His Ala Val Arg Leu Phe Ser His Asn Glu Gly Ile Ala Asp Pro Asp
                      405                      410                      415
Asn Arg Leu Thr Leu Ser Lys Thr His Lys Asp Val Leu Gly Ile Pro
                      420                      425                      430
His Pro Glu Val Tyr Tyr Lys Leu Pro Glu Tyr Thr Val Lys Ser Cys
                      435                      440                      445
Asp His Thr Lys Glu Leu Phe Lys Glu Leu Met Ala Leu Met Ser Gly
                      450                      455                      460
Thr Asp Pro Gln Trp Thr Lys Gly Tyr Phe Pro Gln Cys His Pro Ser
465                      470                      475                      480
Gly Ser Thr Ile Met Gly Thr Asp Pro Thr Asn Ser Val Val Asp Gly
                      485                      490                      495
Glu Cys Arg Thr His Asp His Glu Asn Leu Phe Val Ala Arg Ser Ala
                      500                      505                      510
Val Phe Ser Ser Val Gly Thr Gly Asn Ile Thr Leu Thr Ile Gly Ala
                      515                      520                      525
Leu Ala Leu Arg Val Ala Ala Ser Leu Lys Lys Glu Met Leu His Ala
                      530                      535                      540

```

<210> 2

<211> 1632

3/30

<212> DNA

<213> *Gluconobacter oxydans*

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)... (1632)

<400> 2

```

agt tct tcg aat tcc ctt tcg gca gat gtc gtg atc gtg gga tcc ggc      48
Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly
   1             5             10             15
gtc gca ggg gcc agt att gcc aac gaa ctt gcg aga gcc ggc ctc tcc      96
Val Ala Gly Ala Ser Ile Ala Asn Glu Leu Ala Arg Ala Gly Leu Ser
           20             25             30
gtc atc gtt ctt gaa gcc ggc ccc cgg atc gac cgc cag cat att ctt     144
Val Ile Val Leu Glu Ala Gly Pro Arg Ile Asp Arg Gln His Ile Leu
           35             40             45
gaa aat ttc cgc acc acg gaa aac aag gga gca tac cag ctt ccc tac     192
Glu Asn Phe Arg Thr Thr Glu Asn Lys Gly Ala Tyr Gln Leu Pro Tyr
           50             55             60
cca ccc gtg cct tgg gcg atg cat cgg cct gat cag ggc tct ccc aat     240
Pro Pro Val Pro Trp Ala Met His Pro Pro Asp Gln Gly Ser Pro Asn
           65             70             75             80
ggc tat ctg cat acg acc gga cct gac ggt gct gcg tat cag cag ggc     288
Gly Tyr Leu His Thr Thr Gly Pro Asp Gly Ala Ala Tyr Gln Gln Gly
           85             90             95
tat ctg cgt gtt gtc ggg gga acg acc tgg cat tgg gca gga tgt gcc     336
Tyr Leu Arg Val Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Gly Cys Ala
           100            105            110
tgg cgg tat ctc ccc tct gac ttc gag tta cat tcc cga tat ggc gtt     384
Trp Arg Tyr Leu Pro Ser Asp Phe Glu Leu His Ser Arg Tyr Gly Val
           115            120            125
ggc cgc gac tgg gcc atc aag tac gat gat ctg gag cca ttc tac tat     432
Gly Arg Asp Trp Ala Ile Lys Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Phe Tyr Tyr
           130            135            140
cag gcc gaa gtc atg atg ggc gtg gca ggc cct aac atg gat gtc gat     480
Gln Ala Glu Val Met Met Gly Val Ala Gly Pro Asn Met Asp Val Asp
           145            150            155            160
gac ctg gga tct cca cga tct cac aat tac ccg atg aag gaa gta ccc     528
Asp Leu Gly Ser Pro Arg Ser His Asn Tyr Pro Met Lys Glu Val Pro
           165            170            175
ctg tcc tat ggc gcg gat cag ttt cgc aaa ctg atc cat gag aag acg     576
Leu Ser Tyr Gly Ala Asp Gln Phe Arg Lys Leu Ile His Glu Lys Thr
           180            185            190
aat tac cgc gtc gtt cac gag cca cag gcc cgt aac act cgc cct tat     624
Asn Tyr Arg Val Val His Glu Pro Gln Ala Arg Asn Thr Arg Pro Tyr

```

4/30

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 195 | 200 | 205 | |
| gac aag cgc cca acc tgt gag ggc aac aac aac tgc atg ccg atc tgt | | | 672 |
| Asp Lys Arg Pro Thr Cys Glu Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| ccg atc ggg gcg atg tac aac gga att cac tcg gtc aat cat gcg gaa | | | 720 |
| Pro Ile Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile His Ser Val Asn His Ala Glu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| gca gca ggc gcc cgt att att ccg aat gcg gtt gtc tac cga ctg gag | | | 768 |
| Ala Ala Gly Ala Arg Ile Ile Pro Asn Ala Val Val Tyr Arg Leu Glu | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| acc gac gcc agc aac aag aag gtc gtg ccc gta aat tat tac gat ccc | | | 816 |
| Thr Asp Ala Ser Asn Lys Lys Val Val Pro Val Asn Tyr Tyr Asp Pro | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| gat aag aat tct cat cgt gtc acc ggt aag ttc ttc gtg gtc gct gcg | | | 864 |
| Asp Lys Asn Ser His Arg Val Thr Gly Lys Phe Phe Val Val Ala Ala | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| cac tgc att gag agt gcc aag ctg ctc ctg ctg tcc gcc gat gac aaa | | | 912 |
| His Cys Ile Glu Ser Ala Lys Leu Leu Leu Leu Ser Ala Asp Asp Lys | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| aat ccc cgg ggc att gcc aac agt tca gat cag gtt ggt cgg aac atg | | | 960 |
| Asn Pro Arg Gly Ile Ala Asn Ser Ser Asp Gln Val Gly Arg Asn Met | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| atg gat cac acg gcc gta cag ctc tcg ttt atg agc gga aac gac tct | | | 1008 |
| Met Asp His Thr Gly Val Gln Leu Ser Phe Met Ser Gly Asn Asp Ser | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| ctg tgg ccg ggt cgt ggt cct ctg ctg acc agc att atc gac tcg ttt | | | 1056 |
| Leu Trp Pro Gly Arg Gly Pro Leu Leu Thr Ser Ile Ile Asp Ser Phe | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| cgt gac ggc cca tgg cgg agc gaa cgt ggt gcg tat ctt gtg cat atg | | | 1104 |
| Arg Asp Gly Pro Trp Arg Ser Glu Arg Gly Ala Tyr Leu Val His Met | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| gtt gac gat aat cag gtc gac ttc gca acg ggt ctg gcg att gcc aag | | | 1152 |
| Val Asp Asp Asn Gln Val Asp Phe Ala Thr Gly Leu Ala Ile Ala Lys | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| ggc tat gtc ggg aaa gag ctg gaa gag cag atc cgt tat ggc tcc tct | | | 1200 |
| Gly Tyr Val Gly Lys Glu Leu Glu Glu Gln Ile Arg Tyr Gly Ser Ser | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| cat gcc gtt cgt ctc ttc agc cat aac gaa ggc att gcc gac ccc gac | | | 1248 |
| His Ala Val Arg Leu Phe Ser His Asn Glu Gly Ile Ala Asp Pro Asp | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| aac cgg ctg aca ctg agc aaa aca cat aaa gac gtt ctg ggc att cct | | | 1296 |
| Asn Arg Leu Thr Leu Ser Lys Thr His Lys Asp Val Leu Gly Ile Pro | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| cac ccc gaa gtc tat tac aag ctt ccc gag tac aca gtg aag agt tgt | | | 1344 |
| His Pro Glu Val Tyr Tyr Lys Leu Pro Glu Tyr Thr Val Lys Ser Cys | | | |
| 435 | 440 | 445 | |

5/30

```

gac cat acc aag gag ctg ttc aag gaa ctg atg gct ctg atg agt ggt 1392
Asp His Thr Lys Glu Leu Phe Lys Glu Leu Met Ala Leu Met Ser Gly
    450                455                460
act gat cct caa tgg aca aag ggt tac ttc ccg cag tgc cat ccg tcg 1440
Thr Asp Pro Gln Trp Thr Lys Gly Tyr Phe Pro Gln Cys His Pro Ser
465                470                475                480
ggc agc acg atc atg gga aca gac ccc acc aat tcg gtc gtt gac ggt 1488
Gly Ser Thr Ile Met Gly Thr Asp Pro Thr Asn Ser Val Val Asp Gly
    485                490                495
gag tgc cgc acc cat gac cac gaa aac ctg ttt gtt gcc aga tca gcg 1536
Glu Cys Arg Thr His Asp His Glu Asn Leu Phe Val Ala Arg Ser Ala
    500                505                510
gtc ttc tct tcg gtc ggt aca ggc aat atc acc ctg acc att ggc gcg 1584
Val Phe Ser Ser Val Gly Thr Gly Asn Ile Thr Leu Thr Ile Gly Ala
    515                520                525
ctg gcg ctt cgc gtt gca gca tcc ctg aaa aag gag atg ctt cat gcg 1632
Leu Ala Leu Arg Val Ala Ala Ser Leu Lys Lys Glu Met Leu His Ala
    530                535                540

```

<210> 3
 <211> 156
 <212> PRT
 <214> Gluconobacter oxydans

```

<400> 3
Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe
 1          5          10          15
Phe Glu Val Ser Arg Arg Leu Met Asp Arg Glu Lys Val His Pro Leu
 20          25          30
Ile Gly Gln Ala Leu Tyr Asp Thr Leu Leu Ser Gln Arg Ala Ala Tyr
 35          40          45
Arg Ser Glu Ile Asn Gln Leu His Asp Leu Leu Thr Thr Lys Glu Phe
 50          55          60
Ser Ser Ala Ala Glu Phe Ala Arg Glu Ala Glu His Ser Asp Asn Ala
 65          70          75          80
Leu Lys Glu Thr Ile His Ala Leu Met His Gly Trp Tyr Arg Gly Val
 85          90          95
Val Gly Gln Thr Val Val Val Tyr Arg Ala Ala Ala Met Phe Ala Leu
100          105          110
Thr Asp Asp Ala Val Phe Pro Lys Thr Tyr Ala Thr Ala Arg Pro Phe
115          120          125
Tyr Trp Thr Glu Lys Pro Pro Val Val Glu Thr Pro Thr Ala Ala Pro
130          135          140
Ala Leu Ser Pro Ser Glu Tyr Val Ala Glu Ser Gln
145          150          155

```

6/30

<210> 4
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> *Gluconobacter oxydans*

<220>
 <221> mat peptide
 <222> (124)... (591)

<400> 4
 gtg tta aaa aac cta tat aca aac cgt cat gat cta aga cgg cct ctt 48
 Met Leu Lys Asn Leu Tyr Thr Asn Arg His Asp Leu Arg Arg Pro Leu
 -40 -35 -30
 ctc cgg gtc tca cgc cgt ggg ata ttg gcg ggt gga atc agt ctt ttg 96
 Leu Arg Val Ser Arg Arg Gly Ile Leu Ala Gly Gly Ile Ser Leu Leu
 -25 -20 -15 -10
 aca gcg act tca cta cgc tta cat gca gag gaa gcg aag tct cct ctc 144
 Thr Ala Thr Ser Leu Arg Leu His Ala Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu
 -5 1 5
 gca agc cgg gac gag tat gaa cgc ttc ttc gaa gtg tct cgt cgc ctc 192
 Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Ser Arg Arg Leu
 10 15 20
 atg gat cgg gaa aaa gtc cat cct ctc atc ggg cag gcc ctc tac gac 240
 Met Asp Arg Glu Lys Val His Pro Leu Ile Gly Gln Ala Leu Tyr Asp
 25 30 35
 act ctt ttg tct caa aga gca gcc tac cga agt gag atc aat caa ctg 288
 Thr Leu Leu Ser Gln Arg Ala Ala Tyr Arg Ser Glu Ile Asn Gln Leu
 40 45 50 55
 cat gat ctt ctc act aca aaa gag ttt agt tca gcc gcc gaa ttt gcc 336
 His Asp Leu Leu Thr Thr Lys Glu Phe Ser Ser Ala Ala Glu Phe Ala
 60 65 70
 cgt gag gcc gag cat tct gac aac gcg ctg aaa gag acc att cat gcc 384
 Arg Glu Ala Glu His Ser Asp Asn Ala Leu Lys Glu Thr Ile His Ala
 75 80 85
 ctg atg cac gcc tgg tat cgg ggc gtc gtg ggt cag aca gtc gtc gtc 432
 Leu Met His Gly Trp Tyr Arg Gly Val Val Gly Gln Thr Val Val Val
 90 95 100
 tac cgt gcg gcc gcc atg ttt gct ctg act gat gat gcg gtc ttt ccc 480
 Tyr Arg Ala Ala Ala Met Phe Ala Leu Thr Asp Asp Ala Val Phe Pro
 105 110 115
 aag act tat gcg aca gcg aga ccc ttc tac tgg act gaa aag cca cca 528
 Lys Thr Tyr Ala Thr Ala Arg Pro Phe Tyr Trp Thr Glu Lys Pro Pro
 120 125 130 135
 gtc gtt gag acg cca aca gcg gcc ccg gca ctg tct cca tcg gaa tat 576

7/30

Val Val Glu Thr Pro Thr Ala Ala Pro Ala Leu Ser Pro Ser Glu Tyr
 140 145 150
 gtc gca gaa tcc cag
 Val Ala Glu Ser Gln
 155

591

<210> 5
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Gluconobacter oxydans

<400> 5
 Met Arg Glu Gly Asn Lys Ala Gly Ile Arg Arg Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Ile Ala Ser Gly Val Leu Phe Gly Ala Gln Ser Ala Arg Ala Glu
 20 25 30
 Asp Gln Ala Thr Thr Ile Ser Arg Gly Ala Tyr Leu Ala Thr Ala Gly
 35 40 45
 Asp Cys Val Ala Cys His Thr Lys Pro Gly Gly Ala Pro Phe Ala Gly
 50 55 60
 Gly Leu Val Ile Ala Ser Pro Met Gly Gly Ile Val Ala Ser Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Ile Gly Lys Tyr Thr Glu Glu Glu Phe
 85 90 95
 Ala Asn Ala Leu Arg Lys Gly Ile Arg Arg Asp Gly Ala His Leu Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Met Pro Tyr Thr Ala Tyr Ser Glu Ile Ala Asp Thr Asp Ile
 115 120 125
 His Ala Leu Tyr Val Tyr Phe Met His Gly Val Ala Pro Leu Arg Gln
 130 135 140
 Asp Asn Pro Lys Thr Glu Leu Lys Phe Pro Phe Asn Ile Arg Ala Met
 145 150 155 160
 Met Ile Ser Trp Asn Leu Leu Phe Ala Gly Pro Pro Pro Ala Lys Gly
 165 170 175
 Asp Pro Gln Thr Tyr Ser Thr Ile Glu Arg Gly His Tyr Leu Ala Asp
 180 185 190
 Ala Leu Gly His Cys Gly Thr Cys His Thr Pro Arg Asn Phe Leu Met
 195 200 205
 Gly Glu Arg Ser Ser Ser Ala Tyr Leu Gly Gly Thr Pro Leu Ala Gly
 210 215 220
 Trp Tyr Ala Pro Asn Ile Thr Pro Ser Met Asn Ser Gly Ile Gly Asp
 225 230 235 240
 Trp Ser Glu Asp Asp Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro
 245 250 255
 Gly Arg Ala Gln Ala Ala Gly Met Met Gly Glu Ala Val Glu His Ser

8/30

260 265 270
 Phe Ser Lys Leu Thr Asp Glu Asp Leu His Ala Ile Ala Ala Tyr Ile
 275 280 285
 Arg Gln Ile Pro Lys Ile Glu Asp Ser Gln Ala Lys Gln Pro Arg Asp
 290 295 300
 Arg Phe Gly Val Ala Val Gln Pro Ile Val Asp Leu Gln Lys Pro Lys
 305 310 315 320
 Leu Asp Arg Glu Asp Asp Leu Phe Pro Met Asp Gly Glu Arg Ile Tyr
 325 330 335
 Val Asn Asn Cys Ala Ala Cys His Gly Leu Asp Gly Ala Gly Ala Ala
 340 345 350
 Asp His Phe Thr Pro Ser Leu Ser Ser Asn Ala Val Val Gly Ala Pro
 355 360 365
 Gly Ala Asp Asn Leu Ile Met Ala Ile Val Asn Gly Val Asp Arg Thr
 370 375 380
 Thr Asn Gly His His Val Leu Met Pro Gly Phe Gly Pro Thr Ser Asp
 385 390 395 400
 Val Gln Arg Leu Ser Asp Thr Asp Val Ala Lys Leu Thr Asn Tyr Val
 405 410 415
 Ser Gly Thr Phe Gly Ser Gly Asp His His Val Thr Ala Gln Asp Val
 420 425 430
 Lys Val Ala Arg Glu Gly Gly Pro Leu Pro Ala Leu Val Lys Asp Met
 435 440 445
 Pro Ala Leu Ile Gly Ala Gly Val Ile Ala Ala Phe Ala Ala Met Ser
 450 455 460
 Cys Leu Ile Trp Trp Phe Arg Arg Arg Thr Gln Lys Gln Lys
 465 470 475

<210> 6
 <211> 1434
 <213> DNA
 <214> Gluconobacter oxydans

<220>
 <221> mat peptide
 <222> (1)... (1434)

<400> 6
 atg cgt gag ggg aat aaa gcc gga ata cgc cgc ctc ttt ctg cca gct 48
 Met Arg Glu Gly Asn Lys Ala Gly Ile Arg Arg Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 gcc ata gct tgc ggt gtc ctg ttc gcc gcg cag tca gcg agg gca gag 96
 Ala Ile Ala Ser Gly Val Leu Phe Gly Ala Gln Ser Ala Arg Ala Glu
 20 25 30
 gat cag gcc acc act atc agc cga gcc gcc tat ctg gct aca gca ggc 144

9/30

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Asp | Gln | Ala | Thr | Thr | Ile | Ser | Arg | Gly | Ala | Tyr | Leu | Ala | Thr | Ala | Gly | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | |
| gac | tgc | gtt | gcc | tgc | cat | acg | aaa | cca | ggg | ggt | ccc | ttt | gcg | ggc | | 192 | |
| Asp | Cys | Val | Ala | Cys | His | Thr | Lys | Pro | Gly | Gly | Ala | Pro | Phe | Ala | Gly | | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | | |
| ggc | ctt | gtc | att | gcg | tcc | cca | atg | ggc | ggg | atc | gtc | gcg | tcc | aac | att | 240 | |
| Gly | Leu | Val | Ile | Ala | Ser | Pro | Met | Gly | Gly | Ile | Val | Ala | Ser | Asn | Ile | | |
| | | 65 | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | | |
| aca | ccc | gat | ccg | gat | acg | gga | att | ggc | aaa | tac | acc | gaa | gag | gag | ttt | 288 | |
| Thr | Pro | Asp | Pro | Asp | Thr | Gly | Ile | Gly | Lys | Tyr | Thr | Glu | Glu | Glu | Phe | | |
| | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| gcc | aac | gct | ctt | cgc | aag | ggg | att | cgc | agg | gac | gga | gct | cat | ctc | tat | 336 | |
| Ala | Asn | Ala | Leu | Arg | Lys | Gly | Ile | Arg | Arg | Asp | Gly | Ala | His | Leu | Tyr | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | |
| ccg | gcc | atg | cct | tac | acg | gcc | tat | tcg | gag | att | gcg | gat | acg | gac | atc | 384 | |
| Pro | Ala | Met | Pro | Tyr | Thr | Ala | Tyr | Ser | Glu | Ile | Ala | Asp | Thr | Asp | Ile | | |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | |
| cac | gca | ttg | tat | gtc | tac | ttc | atg | cat | ggc | gtg | gcc | ccc | ctg | cgg | cag | 432 | |
| His | Ala | Leu | Tyr | Val | Tyr | Phe | Met | His | Gly | Val | Ala | Pro | Leu | Arg | Gln | | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | |
| gac | aat | ccg | aag | acg | gag | ctg | aaa | ttc | ccc | ttc | aat | atc | cgc | gca | atg | 480 | |
| Asp | Asn | Pro | Lys | Thr | Glu | Leu | Lys | Phe | Pro | Phe | Asn | Ile | Arg | Ala | Met | | |
| | | 145 | | | | 150 | | | | 155 | | | | 160 | | | |
| atg | atc | agc | tgg | aat | ctc | ctg | ttc | gca | gga | cct | ccg | ccc | gca | aag | ggg | 528 | |
| Met | Ile | Ser | Trp | Asn | Leu | Leu | Phe | Ala | Gly | Pro | Pro | Pro | Ala | Lys | Gly | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| gat | cct | cag | acc | tat | tcc | aca | atc | gaa | aga | ggc | cac | tat | ctc | gca | gat | 576 | |
| Asp | Pro | Gln | Thr | Tyr | Ser | Thr | Ile | Glu | Arg | Gly | His | Tyr | Leu | Ala | Asp | | |
| | | | 180 | | | | | | 185 | | | | 190 | | | | |
| gcc | ttg | gga | cat | tgc | gga | acc | tgt | cat | aca | cca | cgc | aat | ttc | ctg | atg | 624 | |
| Ala | Leu | Gly | His | Cys | Gly | Thr | Cys | His | Thr | Pro | Arg | Asn | Phe | Leu | Met | | |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
| ggc | gaa | cgc | agc | agc | agt | gcc | tat | ctt | ggc | gga | acg | ccg | ctc | gct | ggc | 672 | |
| Gly | Glu | Arg | Ser | Ser | Ser | Ala | Tyr | Leu | Gly | Gly | Thr | Pro | Leu | Ala | Gly | | |
| | | 210 | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | |
| tgg | tat | gct | ccc | aac | atc | aca | ccg | agc | atg | aat | agc | ggg | atc | ggc | gat | 720 | |
| Trp | Tyr | Ala | Pro | Asn | Ile | Thr | Pro | Ser | Met | Asn | Ser | Gly | Ile | Gly | Asp | | |
| | | | | | 225 | | 230 | | | | 235 | | | 240 | | | |
| tgg | agc | gaa | gac | gat | ctg | gtt | cag | tac | ctg | cgt | aca | ggc | tcc | gtg | cca | 768 | |
| Trp | Ser | Glu | Asp | Asp | Leu | Val | Gln | Tyr | Leu | Arg | Thr | Gly | Ser | Val | Pro | | |
| | | | | | 245 | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| gga | cgt | gct | cag | gcg | gca | ggc | atg | atg | ggc | gaa | gct | gtt | gaa | cat | agc | 816 | |
| Gly | Arg | Ala | Gln | Ala | Ala | Gly | Met | Met | Gly | Glu | Ala | Val | Glu | His | Ser | | |
| | | | 260 | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | |
| ttt | agc | aag | ctg | aca | gac | gag | gat | ctc | cac | gcg | atc | gcc | gcc | tat | atc | 864 | |
| Phe | Ser | Lys | Leu | Thr | Asp | Glu | Asp | Leu | His | Ala | Ile | Ala | Ala | Tyr | Ile | | |

10/30

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|------|
| | 275 | 280 | 285 | |
| cga cag atc cca aag atc gag gac agc caa gca aaa cag ccg cgt gac | | | | 912 |
| Arg Gln Ile Pro Lys Ile Glu Asp Ser Gln Ala Lys Gln Pro Arg Asp | | | | |
| 290 | 295 | 300 | | |
| cgg ttc ggg gtt gcc gtc cag ccc atc gtg gat ctg cag aag cca aaa | | | | 960 |
| Arg Phe Gly Val Ala Val Gln Pro Ile Val Asp Leu Gln Lys Pro Lys | | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 | |
| ctt gat cgt gaa gat gac ctg ttt ccg atg gac ggg gag agg atc tac | | | | 1008 |
| Leu Asp Arg Glu Asp Asp Leu Phe Pro Met Asp Gly Glu Arg Ile Tyr | | | | |
| | 325 | 330 | 335 | |
| gtc aac aac tgt gca gcc tgc cat gga ctt gat ggt gca gga gcg gcc | | | | 1056 |
| Val Asn Asn Cys Ala Ala Cys His Gly Leu Asp Gly Ala Gly Ala Ala | | | | |
| | 340 | 345 | 350 | |
| gga gct gac aat ctg atc atg gcc att gtc aac ggc gtt gat cgc acg | | | | 1152 |
| Asp His Phe Thr Pro Ser Leu Ser Ser Asn Ala Val Val Gly Ala Pro | | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| gat cac ttc acg ccc tct ctg tcc tcc aat gca gta gtc ggt gca ccg | | | | 1104 |
| Gly Ala Asp Asn Leu Ile Met Ala Ile Val Asn Gly Val Asp Arg Thr | | | | |
| | 370 | 375 | 380 | |
| acg aat ggt cat cac gtt ctg atg ccg ggt ttc ggc ccc act tcc gat | | | | 1200 |
| Thr Asn Gly His His Val Leu Met Pro Gly Phe Gly Pro Thr Ser Asp | | | | |
| | 385 | 390 | 395 | 400 |
| gta caa cgg ctc agc gat acg gat gtg gcg aaa ctc acc aac tat gtc | | | | 1248 |
| Val Gln Arg Leu Ser Asp Thr Asp Val Ala Lys Leu Thr Asn Tyr Val | | | | |
| | 405 | 410 | 415 | |
| tcc ggg aca ttt gga agt ggc gat cat cat gtc aca gct cag gac gta | | | | 1296 |
| Ser Gly Thr Phe Gly Ser Gly Asp His His Val Thr Ala Gln Asp Val | | | | |
| | 420 | 425 | 430 | |
| aag gtc gct cgt gaa ggc ggg cct ctg cca gca cta gtg aag gat atg | | | | 1344 |
| Lys Val Ala Arg Glu Gly Gly Pro Leu Pro Ala Leu Val Lys Asp Met | | | | |
| | 435 | 440 | 445 | |
| ccg gcc tta att ggg gct ggt gtt att gca gcc ttt gca gca atg tca | | | | 1392 |
| Pro Ala Leu Ile Gly Ala Gly Val Ile Ala Ala Phe Ala Ala Met Ser | | | | |
| | 450 | 455 | 460 | |
| tgc ctg atc tgg tgg ttc aga cgg cgc act caa aaa cag aaa | | | | 1434 |
| Cys Leu Ile Trp Trp Phe Arg Arg Arg Thr Gln Lys Gln Lys | | | | |
| 465 | 470 | 475 | | |

<210> 7

<211> 5187

<212> DNA

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> -35 signal

<222> (547)... (552)
 <221> -10 signal
 <222> (571)... (576)
 <221> CDS
 <222> (681)... (1274)
 <221> mat peptide
 <222> (804)... (1271)
 <221> CDS
 <222> (1293)... (2930)
 <221> mat peptide
 <222> (1296)... (2927)
 <221> CDS
 <222> (2923)... (4359)
 <221> mat peptide
 <222> (2923)... (4356)

<400> 7
 gcgccaaagct ttgcgctggc gggcggttaa tcatttcata aacgggagcg ggttcctgtt 60
 ttctgttttc ttactcggg ggcatgacag ctttttttc cattgtctca tgaggaaatc 120
 ttggctttac gcaccattct tgcagccaga ccggtccatt cctcaggcat gacacttcaa 180
 cagcacatct taggttccaa ggccatgatg cgaaaaaaca ggctttccaa acattcgata 240
 agactatgag tattttggca tcttatgtcc ttgatctagg ctgtatatatt tatttttctg 300
 atattttctt gcgctttggc aagctgaata gctcgatttt ccgagctccc cctcttctc 360
 tccaaaaaag gggacttacg agcacctaatt tccacaacat attgttttaa atgtataatt 420
 tccggacaat cttttttctt tcgaatatatt ttctactga tgettctgt atctgacaca 480
 aaaaaaatca cccatatcta cggaacgagg tgagatagtc acaaataagt gagttcaatt 540
 tagcagttta ctttcacaac aaacgggtgc tagaaccaca acctaagtgc gaaatgaata 600
 caaataaacc aattaaacga ggtgtgtctac acagtaatta atatgaatca cctagaaaaa 660
 ggaaaggata aaactgtact gtgttaaaaa acctatatac aaaccgtcat gatctaagac 720
 ggctcttctt ccgggtctca cgcggtggga tattggcggg tggaatcagt cttttgacag 780
 cgacttcaat acgcttacat gcagaggaag cgaagtctcc tctcgcaagc cgggacgagt 840
 atgaacgctt ctctgaagtg tctcgtcgcc tcatggatcg ggaaaaagtc catcctctca 900
 tcgggcaggc cctctacgac actcttttgt ctcaaagagc agcctaccga agtgagatca 960
 atcaactgca tgatcttctc actacaaaag agtttagttc agccgccgaa tttgcccggtg 1020
 aggcggagca ttctgacaac gcgctgaaag agaccattca tgccctgatg cacggctggt 1080
 atcggggcgt cgtgggtcag acagtcgtcg tctaccgtgc ggccgccatg tttgctctga 1140
 ctgatgatgc ggtctttccc aagacttatg cgacagcgag acccttctac tggactgaaa 1200
 agccaccagt cgttgagacg ccaacagcgg ccccggaact gtctccatcg gaatatgtcg 1260
 cagaatccca gtaagaaacg gatgttatatt caatgagttc ttgaattcc ctttcggcag 1320
 atgtcgtgat cgtgggatcc ggcgtcgag gggccagtat tgccaacgaa cttgcgagag 1380
 ccggcctctc cgtcatcgtt cttgaagccg gccccggat cgaccgccag catattcttg 1440
 aaaatttccg caccacggaa aacaaggag cataccagct tccctacca cccgtgcctt 1500
 gggcgatgca tccgcctgat cagggtctc ccaatggcta tctgcatacg accggacctg 1560
 acgggtgtgc gtatcagcag ggctatctgc gtgttgcgg gggaacgacc tggcattggg 1620
 caggatgtgc ctggcggtat ctcccctctg acttcgagtt acattcccga tatggcggtg 1680
 gccgcgactg ggccatcaag tacgatgatc tggagccatt ctactatcag gccgaagtca 1740

```

tgatgggctt ggcaggccct aacatggatg tcatgacct gggatctcca cgatctcaca 1800
attacccgat gaaggaagta cccctgtcct atggcgcgga tcagtttcgc aaactgatcc 1860
atgagaagac gaattaccgc gtcgttcacg agccacaggc ccgtaacact cgccttatg 1920
acaagcgccc aacctgtgag ggcaacaaca actgcatgcc gatctgtccg atcggggcga 1980
tgtacaacgg aattcactcg gtcaatcatg cggaagcagc aggcgcccgt attattccga 2040
atgcggttgt ctaccgactg gagaccgacg ccagcaacaa gaaggctcgt cccgtaaatt 2100
attacgatcc cgataagaat tctcatcgtg tcaccggtaa gttcttcgtg gtcgctgcgc 2160
actgcattga gagtgccaaag ctgctcctgc tgtccgccga tgacaaaaat ccccggggca 2220
ttgccaacag ttcagatcag gttggtcgga acatgatgga tcacacgggc gtacagctct 2280
cgtttatgag cggaaacgac tctctgtggc cgggtcgtgg tctctgctg accagcatta 2340
tcgactcgtt tcgtgacggc ccatggcgga gcgaacgtgg tgcgtatctt gtgcatatgg 2400
ttgacgataa tcaggtcgac ttcgcaacgg gtctggcgat tgccaagggc tatgtcggga 2460
aagagctgga agagcagatc cgttatggct cctctcatgc cgttcgtctc ttcagccata 2520
acgaaggcat tgccgacccc gacaaccggc tgacactgag caaaacacat aaagacgttc 2580
tgggcattcc tcaccccgaa gtctattaca agcttcccga gtacacagtg aagagttgtg 2640
accataccaa ggagctgttc aaggaactga tggtctctgat gagtggtaact gatcctcaat 2700
ggacaaaggg ttacttcccg cagtgccatc cgtcgggcag cagcatcatg ggaacagacc 2760
ccaccaattc ggtcgttgac ggtgagtgcc gcacccatga ccacgaaaac ctgtttgttg 2820
ccagatcagc ggtcttctct tcggtcggta caggcaatat caccctgacc attggcgcg 2880
tggcgcttcg cgttgacgca tccctgaaaa aggagatgct tcatgctga ggggaataaa 2940
gccggaatac gccgectctt tctgccagct gccatagctt cgggtgtcct gttcggcgcg 3000
cagtcagcga gggcagagga tcaggccacc actatcagcc gaggcgccta tctggctaca 3060
gcaggcgact gcgttgccgt ccatacgaaa ccagggtggg ctccctttgc gggcggcctt 3120
gtcattgcgt ccccaatggg cgggatcgtc gcgtccaaca ttacaccga tccgatacgc 3180
ggaattggca aatacaccca agaggagttt gccaacgctc ttgcgaaggg tattcgacgc 3240
gacggagctc atctctatcc ggccatgcct tacaaggcct attcggagat tgcggatacgc 3300
gacatccacg cattgtatgt ctacttcatg catggcgtgg ccccccctgc gcaggacaat 3360
ccgaagacgg agctgaaatt ccccttcaat atccgcgcaa tgatgatcag ctggaatctc 3420
ctgttcgcag gacctccgcc cgcaaagggt gatcctcaga cctattccac aatcgaaaga 3480
ggccactatc tcgcagatgc cttgggacat tgcggaacct gtcatacacc acgcaatttc 3540
ctgatgggcg aacgcagcag cagtgcctat cttggcgga cgcgcctcgc tggctggtat 3600
gctcccaaca tcacaccgag catgaatagc gggatcggcg attggagcga agacgatctg 3660
gttcagtacc tgcgtacagg ctccgtgccg ggacgtgctc aggcggcagg catgatgggc 3720
gaagctgttg aacatagctt tagcaagctg acagacgagg atctccacgc gatcgccgcc 3780
tatatccgac agatcccaaa gatcgaggac agccaagcaa aacagccgcg tgaccggttc 3840
ggggttgccg tccagcccat cgtggatctg cagaagccaa aacttgatcg tgaagatgac 3900
ctgtttccga tggacgggga gaggatctac gtcaacaact gtgcagcctg ccatggactt 3960
gatggtgcag gagcgccga tcacttcacg cctctctgt cctccaatgc agtagtcgtt 4020
gcaccgggag ctgacaatct gatcatggcc attgtcaacg gcgttgatcg caccagcaat 4080
ggtcatcacg ttctgatgcc gggtttcggc cccacttccg atgtacaacg gtcagcgat 4140
acggatgtgg cgaaactcac caactatgtc tccgggacat ttggaagtgg cgatcatcat 4200
gtcacagctc aggacgtaaa ggtcgtcgtg gaaggcgggc ctctgccagc actagtgaag 4260
gatatgccgg ccttaattgg ggtggtgtt attgcagcct ttgcagcaat gtcatgcctg 4320
atctggttgt tcagacggcg cactcaaaaa cagaaataat caaaatatta tttaatatta 4380
ccttcgatat aattatcga aggtaatat ctgtacaaat aatatctttc agtattaaaa 4440
tcgaacatat atttatatat ctgatcaatc acaggaaaca tctagtgtac tcaaagcgta 4500

```

13/30

```

tcttcctgc tctttctgt atcggtctt tatcgatctt ttctccttc tccgcgatag 4560
ccaggacag catcgacaaa ggatttatc cttcgggcaa tgttcaagtc atcgcacgct 4620
ttccgaatgt acaagcctcg ggtatcgcca ttcttcgtga tggccgaatg attgtagggt 4680
ttctctgcag cgttcataa cagcgaggaa ctctgttcgg aatttacctc aaaggcaaga 4740
tccttcctgt tctgatact tcttctcaac aacagtttgt ctctccctct gggcatgaat 4800
gtaaatcaa agggcacact ctggatctc gacgaaggca tgttgatgg tcagggtaca 4860
attgccggcg cgcagaagct ctttgaaatt gacctgcct caaatcgat tgcagaatt 4920
tacaccatta cggccctgc tctctcctc gacagtcatt tgaacgacg tcggatcgat 4980
ttgactcatg gtgcaaatg cacagcattc ataactgaca cgtctaccag caaccatccc 5040
ggtatcattg tgatcgattt ggcgacaggt gcgcaaaggc gtatcctagc taacgcgcag 5100
gttgtctcgg gagaagctgg ctttgtcagc atgattgacg ggatacttgc ccgtcacgat 5160
tcataaatc caactcttc gcgagga 5187

```

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Gluconobacter oxydans

<220>
 <223> N-terminal sequence of large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 8
 Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Ala
 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Gluconobacter oxydans

<220>
 <223> N-terminal sequence of small subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 9
 Glu Glu Ala Lys Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe
 1 5 10 15
 Phe Glu Val Ser
 20

<210> 10
 <211> 20

14/30

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<223> N-terminal sequence of cytochrome c-like subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 10

Met Arg Glu Gly Asn Lys Ala Gly Ile Arg Arg Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15
Ala Ile Ala Ser
20

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> BINDING

<222> (1)... (5)

<223> Consensus sequence of heme-binding site.

<221> UNSURE

<222> (2)

<223> Optional amino acid.

<221> UNSURE

<222> (3)

<223> Optional amino acid.

<400> 11

Cys Xaa Xaa Cys His
1 5

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> UNSURE

<222> (15)

<223> Unidentified Amino acid.

<400> 12

15/30

Ser Ser Ser Asn Ser Leu Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Xaa Gly
1 5 10 15
Val Val Ala Asp Ala
20

<210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

<220>
<221> UNSURE
<222> (4)
<223> Unidentified Amino acid.

<400> 13
Thr Asn Tyr Xaa Val Val His Glu Pro Gln Ala Arg Asn Thr Arg Pro
1 5 10 15
Tyr Asp Lys

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

<400> 14
Val Val Ala Val Asn Tyr Tyr Asp Pro Asp Lys
1 5 10

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

<400> 15
Glu Val Pro Leu Ser Tyr Gly Ala Asp Gln Phe Arg Lys
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

16/30

<400> 16

Asp Val Leu Gly Ile Pro His Pro Glu Val Tyr Tyr Lys
1 5 10

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 17

Glu Leu Glu Glu Gln Ile Arg Tyr Gly Ser Ser His Ala Val Arg Leu
1 5 10 15
Phe Ser His Asn Glu Gly Ile Ala Asp Pro Asp Asn Arg Leu
20 25 30

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 18

Glu Leu Met Ala Leu Met Ser Gly Thr Asp Pro Gln Trp Thr Lys
1 5 10 15

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> UNSURE

<222> (20)

<224> Unidentified Amino acid.

<400> 19

Glu Glu Ala Lys Ile Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Ile Arg Phe
1 5 10 15
Phe Glu Val Xaa
20

<210> 20

17/30

<211> 20
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

<220>
<221> UNSURE
<222> (4)
<223> Unidentified Amino acid.
<221> UNSURE
<222> (15)
<223> Unidentified Amino acid.

<400> 20
Glu Phe Ser Xaa Ala Ala Glu Phe Ala Arg Glu Ala Glu His Xaa Asp
1 5 10 15
Asn Ala Leu Lys
20

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

<220>
<221> UNSURE
<222> (16)
<223> Unidentified Amino acid.

<400> 21
Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Xaa
1 5 10 15
Arg Arg Leu Met
20

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

<400> 22
Thr Tyr Ala Thr Ala Arg Pro Phe Tyr Trp Thr Glu Lys Pro Pro Val
1 5 10 15
Val Glu Thr Pro
20

18/30

<210> 23
<211> 20
<212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans

<400> 23
Ser Pro Leu Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Phe Phe Glu Val Ser
1 5 10 15
Arg Arg Leu Met
20

<210> 24
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> unsure
<222> (3)
<223> A, G, T or C.
<221> unsure
<222> (6)
<223> A, G, T or C.
<223> Oligonucleotide designed to act as forward primer for amplifying
partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-
sorbitol dehydrogenase.

<400> 24
ggngcngayc arttymg 17

<210> 25
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<221> unsure
<222> (12)
<223> A, G, T or C.
<221> unsure
<222> (15)
<223> A, G, T or C.

19/30

<223> Oligonucleotide designed to act as reverse primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 25
ckraaytgrt cngcncc 17

<210> 26
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> unsure
<222> (6)
<223> A, G, T or C
<221> unsure
<222> (12)
<223> A, G, T or C
<223> Oligonucleotide designed to act as forward primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 26
cayccngarg tntayta 17

<210> 27
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> unsure
<222> (6)
<223> A, G, T or C
<221> unsure
<222> (12)
<223> A, G, T or C
<223> Oligonucleotide designed to act as reverse primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 27
tartanacyt cnggrtg 17

20/30

<210> 28
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> unsure
<222> (15)
<223> A, G, T or C
<223> Oligonucleotide designed to act as forward primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 28
gargarcara thcgnta 17

<210> 29
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as forward primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 29
gargarcara thagrta 17

<210> 30
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> unsure
<222> (3)
<223> A, G, T or C
<223> Oligonucleotide designed to act as reverse primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

21/30

<400> 30
tancgdatyt gytcytc 17

<210> 31
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as reverse primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 31
tayctdatyt gytcytc 17

<210> 32
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> unsure
<222> (3)
<223> A, G, T or C
<221> unsure
<222> (9)
<223> A, G, T or C
<223> Oligonucleotide designed to act as forward primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 32
acngayccnc artggac 17

<210> 33
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> unsure
<222> (9)

22/30

<223> A, G, T or C

<221> unsure

<222> (15)

<223> A, G, T or C

<223> Oligonucleotide designed to act as reverse primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 33

gtccaytgng grtcngt 17

<210> 34

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as forward primer for amplifying partial nucleotide sequence of DNA encoding large subunit of D-sorbitol dehydrogenase.

<400> 34

gaygtbgtva thgtbgg 17

<210> 35

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of λ phage #1.

<400> 35

tatctgcata cgacc 15

<210> 36

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA

23/30

of λ phage #1.

<400> 36
gaagtcatga tgggc 15

<210> 37
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 37
tgcatacgac cggacc 16

<210> 38
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 38
ttggcactct caatgc 16

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 39
tctgggcatt cctcacc 18

<210> 40

24/30

<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 40
gacgactgtc tgaccc 16

<210> 41
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 41
gacgactgtc tgaccc 16

<210> 42
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 42
ccaaggccat gatgcg 16

<210> 43
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

25/30

<400> 43
cgagcaccta attcc 15

<210> 44
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 44
ctgatcatca ttgcg 15

<210> 45
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 45
ccgatgagag gatgg 15

<210> 46
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #1.

<400> 46
attcggtcgt tgacg 15

<210> 47
<211> 15

26/30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of λ phage #1.

<400> 47

gctgttgaac atagc 15

<210> 48

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of λ phage #1.

<400> 48

ctgcattgag agagtgc 17

<210> 49

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of λ phage #7.

<400> 49

gtacctgcgt acaggc 16

<210> 50

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of λ phage #7.

27/30

<400> 50
gttgccagat cagcgg 16

<210> 51
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 51
ctccgaatag gccgtg 16

<210> 52
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 52
tgatgcacg acgaatg 17

<210> 53
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 53
gtgcaccgac tactgc 16

<210> 54
<211> 16
<212> DNA

28/30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 54

gcagtagtcg gtgcac 16

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 55

acagcacatc ttaggttc 18

<210> 56

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 56

caacgaactt gcgagag 17

<210> 57

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 57

29/30

gatcgcggtgg agatcc 16

<210> 58

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 58

cacggcctat tcggag 16

<210> 59

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 59

gttcatgaac acgcagg 17

<210> 60

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 60

cgaagaatgg cgatacc 17

<210> 61

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30/30

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 61

tggattcgtg acgggc 16

<210> 62

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 62

ccgatgaagg aagtacc 17

<210> 63

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA
of λ phage #7.

<400> 63

ottccgcatg attgacc 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04612

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C12N15/13, C12N9/04, C12N1/21, 12P19/02, C12P7/60 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
|---|--|--|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C12N15/13, C12N9/04, C12N1/21, 12P19/02, C12P7/60 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN), Geneseq/Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X A | FEMS Microbiol. Lett., Vol. 125[1] (1995) Choi E.S. et al., "Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from <i>Gluconobacter suboxydans</i> " p.45-50 | <u>1-12</u> 13-33 |
| X A | Agric. Biol. Chem., Vol.46[1] (1982) Shinagawa E. et al., "Purification and Characterization of D-Sorbitol Dehydrogenase from Membrane of <i>Gluconobacter suboxydans</i> var. α " p.135-141 | <u>1-12</u> 13-33 |
| A | J. Bacteriol., Vol. 179[20] (1997-Oct-13) Stein M.A. et al., "Cloning, Nucleotide Sequence, and Overexpression of <i>smoS</i> , a Component of a Novel Operon Encoding an ABC Transporter and Polyol Dehydrogenases of <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4" p.6335-6340 | 1-33 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 5 November, 1998 (05. 11. 98) | | Date of mailing of the international search report 17 November, 1998 (17. 11. 98) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No. | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04612

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Appl. Environ. Microbiol., Vol. 63[3] (1997-Mar) Kondo K. et al., "Characterization of the Genes Encoding the Three-Component Membrane-Bound Alcohol Dehydrogenase from <i>Gluconobacter suboxydans</i> and Their expression in <i>Acetobacter pasteurianus</i> " p.1131-1138 | 1-33 |
| A | Microbiology, Vol. 141 (1995) Schauder S. et al., "Polyol metabolism of <i>Rhodobacter sphaeroides</i> : biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase" p.1857-1863 | 1-33 |
| A | JP, 5-49480, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 2 March, 1993 (02. 03. 93) (Family: none) | 1-33 |
| A | JP, 6-189790, A (Toyobo Co., Ltd.), 12 July, 1994 (12. 07. 94) (Family: none) | 1-33 |

| | | |
|--|--|--|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁴ C12N15/13, C12N9/04, C12N1/21, 12P19/02, C12P7/60 | | |
| B. 調査を行った分野 | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁴ C12N15/13, C12N9/04, C12N1/21, 12P19/02, C12P7/60 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | |
| WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN), Geneseq/Genbank/EMBL/DBJ/PIR/SwissProt | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X A | FEMS Microbiol. Lett., Vol. 125[1] (1995) Choi E. S. <i>et al.</i> 「Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from <i>Gluconobacter suboxydans</i> 」 p. 45-50 | 1-12 13-33 |
| X A | Agric. Biol. Chem., Vol. 46[1] (1982) Shinagawa E. <i>et al.</i> 「Purification and Characterization of D-Sorbitol Dehydrogenase from Membrane of <i>Gluconobacter suboxydans</i> var. α」 p. 135-141 | 1-12 13-33 |
| A | J. Bacteriol., Vol. 179[20] (1997-Oct-13) Stein M. A. <i>et al.</i> 「Cloning, Nucleotide Sequence, and Overexpression of <i>smoS</i> , a Component of a Novel Operon Encoding an ABC Transporter | 1-33 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | |
| の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって目明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 | 05.11.98 | 国際調査報告の発送日 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3449 |

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| | and Polyol Dehydrogenases of <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4] p. 6335-6340 | |
| A | Appl. Environ. Microbiol., Vol. 63[3] (1997-Mar) Kondo K. <i>et al.</i> 「Characterization of the Genes Encoding the Three-Component Membrane-Bound Alcohol Dehydrogenase from <i>Gluconobacter suboxydans</i> and Their expression in <i>Acetobacter pasteurianus</i> 」 p. 1131-1138 | 1-33 |
| A | Microbiology, Vol. 141 (1995) Schauder S. <i>et al.</i> 「Polyol metabolism of <i>Rhodobacter sphaeroides</i> : biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase」 p. 1857-1863 | 1-33 |
| A | J P, 5-49480, A (旭化成工業株式会社) 2. 3月. 1993 (02. 03. 93) (ファミリーなし) | 1-33 |
| A | J P, 6-189790, A (東洋紡績株式会社) 12. 7月. 1994 (12. 07. 94) (ファミリーなし) | 1-33 |